

**Die Regulation der Acetoinbiosynthese in *Bacillus subtilis*
durch den transkriptionellen Regulator AlsR**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anika March
aus Wolfenbüttel

1. Referent:	Prof. Dr. Dieter Jahn
2. Referent:	PD Dr. Ing. Max Schobert
eingereicht am:	03.06.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am:	02.07.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

T a g u n g s b e i t r ä g e

March, A. & Härtig, E.: Binding studies of the regulator AlsR to the *alsSD* promoter of *Bacillus subtilis*. (Poster) 27th Symposium Mechanisms of Gene Regulation, Göttingen, Deutschland (2008).

March, A. & Härtig, E.: Characterization of the AlsR binding region within the *alsSD* promoter of *Bacillus subtilis*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), Frankfurt, Deutschland (2008).

March, A. & Härtig, E.: Regulation of the *Bacillus subtilis alsSD* operon expression by the transcriptional regulator AlsR. (Poster) International Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms, Tirrenia (Pisa), Italien (2007).

Gruner, I., March, A., Reents, H. & Härtig, E.: Adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Osnabrück, Deutschland (2007).

March, A. & Härtig, E.: Regulation of the *Bacillus subtilis alsSD* operon by the transcriptional regulator AlsR. Poster 26th Symposium Mechanisms of Gene Regulation, Königswinter, Deutschland (2006).

March, A. & Härtig, E.: Regulation of the *Bacillus subtilis alsSD* operon by the transcriptional regulator AlsR. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) und der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen, Deutschland, 2005

...From this the generally accepted LTTR box was identified. It consists of the sequence T-N₁₁-A; but can vary in both base pair composition and length...

Meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	10
1.1 Die Gattung <i>Bacillus</i>	10
1.2 Der anaerobe Stoffwechsel von <i>Bacillus subtilis</i>	11
1.3 Die Regulation der Anaerobiose in <i>Bacillus subtilis</i>	15
1.4 Die Regulation der Acetoinbiosynthese in <i>Bacillus subtilis</i>	18
1.5 Der Transkriptionsregulator AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.5.1 Die LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren (LTTR)	20
1.5.2 Der transkriptionelle Regulator AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	26
2 Zielsetzung	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Geräte	31
3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits	33
3.3 Bakterienstämme und Plasmide	33
3.4 Oligonukleotide	36
3.4.1 Oligonukleotide für Klonierungsarbeiten	36
3.4.2 Oligonukleotide für Primer Extension Analysen	37
3.4.3 Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen	37
3.4.4 Oligonukleotide für <i>alsS</i> DNaseI-Protektionsanalysen	38
3.4.5 Oligonukleotide für <i>alsS</i> <i>in vitro</i> Transkriptionsanalysen	38
3.5 Mikrobiologische Techniken	38
3.5.1 Sterilisation	38
3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten	38
3.5.3 Wachstumsbedingungen für <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	39
3.5.4 Antibiotika	40
3.5.5 Bestimmung der Zelldichte	41
3.5.6 Anlegen von Glyzerinkulturen	41
3.5.7 Test auf Amylase-Aktivität	41
3.6 Molekularbiologische Techniken	42
3.6.1 Herstellung kompetenter <i>Bacillus subtilis</i> Zellen	42
3.6.2 Transformation von <i>Bacillus subtilis</i>	43
3.6.3 Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	43
3.6.4 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation	44

3.6.5	Präparation chromosomaler <i>Bacillus subtilis</i> DNA	44
3.6.6	Plasmid-Präparation	45
3.6.7	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	46
3.6.8	Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation	46
3.6.9	Restriktion von DNA	47
3.6.10	Reinigung von DNA-Fragmenten	47
3.6.11	Ligation von DNA	47
3.6.12	DNA-Gelelektrophorese	48
3.6.13	DNA-Sequenzbestimmung	48
3.6.14	Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	49
3.6.15	Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> Stämmen zum Test von Reporterfusionen	49
3.6.16	Ortsgerichtete Mutagenese	50
3.6.17	Präparation von <i>Bacillus subtilis</i> Gesamtzell-RNA	51
3.6.18	RNA-Gelelektrophorese	52
3.6.19	„Primer Extension“-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des <i>alsR</i> Gens aus <i>Bacillus subtilis</i>	53
3.6.20	Bestimmung der Qualität von <i>Bacillus subtilis</i> Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen mittels Bioanalyzer	55
3.6.21	Microarray-Analysen	55
3.6.22	Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von <i>Bacillus subtilis</i> Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	58
3.6.23	Gelretardationsanalysen (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	62
3.6.24	DNaseI-Protektionsanalysen (DNaseI-Footprint, „DNaseI-Footprinting Analysis“) mit gereinigtem AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	66
3.6.25	Kontaktblot der DNaseI-Protektionsanalysen (DNaseI-Footprint, „DNaseI-Footprinting Analysis“) und Detektion	68
3.6.26	<i>In vitro</i> Transkriptionsanalysen mit gereinigtem AlsR und gereinigter RNA Polymerase (RNAP)	69
3.7	Biochemische Techniken	71
3.7.1	Produktion von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR in <i>Escherichia coli</i>	71
3.7.2	Affinitäts-Chromatographie von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	73
3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigten Proteinen aus <i>Bacillus subtilis</i>	74
3.7.4	Protease-Spaltung zur Entfernung der Affinitäts-Tags von AlsR-Fusionsproteinen	74
3.7.5	Dialyse von gereinigtem und gespaltenem AlsR	75
3.7.6	Analytische Gelpermeations-Chromatographie von AlsR	76
3.7.7	Produktion und Reinigung der RNA Polymerase (RNAP) aus <i>Bacillus subtilis</i>	76
3.7.8	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	78

3.7.9	Messung der Expressionsstärke von Reporterfusionen mittels des β -Galaktosidase Enzymtests	80
4	Ergebnisse und Diskussion	82
4.1	Produktion und Reinigung von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	82
4.1.1	Produktion und Reinigung von Trx/His ₆ -AlsR	82
4.1.2	Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von Trx/His ₆ -AlsR mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)	87
4.1.3	Produktion und Reinigung von Trx/Strep-AlsR	90
4.1.4	Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von Trx/Strep-AlsR mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)	94
4.1.5	Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von AlsR ohne Tag mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)	98
4.1.6	Untersuchung des Oligomerisierungsgrads von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	100
4.2	Definition der AlsR-Bindestelle im Promotor des <i>alsSD</i> Operons	102
4.2.1	DNaseI-Protektionsanalysen zur Definition der AlsR-Bindestelle im Promotor des <i>alsSD</i> Operons	102
4.2.2	Der Einfluss des Bindebereichs von AlsR im <i>alsSD</i> Promotor auf <i>alsS-lacZ</i> Reporterfusionen	106
4.2.3	Definition der für die AlsR-Bindung essentiellen Basenpaare im Promotor des <i>alsSD</i> Operons durch ortsgerichtete Mutagenese	107
4.2.4	Bestätigung postulierten AlsR-Box durch <i>in vitro</i> Gelretardationsanalysen	110
4.3	Der Effektor von AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i>	112
4.3.1	Der intrazelluläre pH-Wert (pH _i) als potentieller Effektor von <i>Bacillus subtilis</i> AlsR	113
4.3.2	Stoffwechselprodukte der Fermentation als potentielle Effektoren von AlsR	119
4.3.3	Der Einfluss potentieller Effektoren auf die Bindungsfähigkeit von AlsR an den <i>alsSD</i> Promotor	122
4.3.4	Der Einfluss potentieller Effektoren auf die Fähigkeit von AlsR zur Transaktivierung der <i>alsSD</i> Operon Transkription	126
4.4	Regulation der Expression von <i>alsR</i> und <i>alsSD</i>	132
4.4.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von <i>alsR</i>	132
4.4.2	Regulation der Expression des <i>alsR</i> Gens	135
4.4.3	Rex-abhängige Regulation der <i>alsS-lacZ</i> Expression	137
4.5	Das AlsR-Regulon	141
4.5.1	Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat	143
4.5.2	Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit einem von 7 auf 6 verringerten externen pH-Wert	149
5	Zusammenfassung	154

6	Summary	155
7	Ausblick	156
8	Referenzen	158
9	Danksagung	163
10	Anhang	164

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAP	Antarktische alkalische Phosphatase
Abb.	Abbildung
AlsD	α -Acetolactatdecarboxylase aus <i>Bacillus subtilis</i>
AlsR	Transkriptioneller Regulator aus <i>Bacillus subtilis</i>
AlsS	α -Acetolactatsynthase aus <i>Bacillus subtilis</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	verzweigt-kettige Aminosäure, „ <i>branched chain amino acid</i> “
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxy-fluorescein
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxy-fluorescein-Acetoxy-methyl-Ester
bp	Basenpaar(e)
β -ME	β -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin, „ <i>bovine serum albumin</i> “
BsFbFP	Flavin-basiertes fluoreszierendes Protein aus <i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cat	Chloramphenicol
Cy3	Carbocyanin3 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy5	Carbocyanin5 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy3-dCTP	5-Amino-Propargyl-2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3
Cy5-dCTP	5-Amino-Propargyl-2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Cy5
Da	Dalton
deion. H ₂ O	deionisiertes Wasser

dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, „ <i>desoxyribonucleic acid</i> “
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dethiothreitol
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMSA	Gelretardationsanalyse, „ <i>electrophoretic mobility shift assay</i> “
EtOH	Ethanol
GFP	Grün fluoreszierendes Protein („ <i>green fluorescent protein</i> “) aus <i>Aequorea victoria</i>
h	Stunde(n)
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxysäure
His ₆ -Tag	6 x Histidin-Tag zur Affinitäts-Chromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie, „ <i>high performance liquid chromatography</i> “
HTH	Helix-Drehung-Helix, „ <i>helix-turn-helix</i> “
HRV 3C Protease	Protease 3C aus dem humanen Rhinovirus, „ <i>Human Rhinovirus 3C Protease</i> “
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galaktosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
Konz.	Konzentration
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
λ	Wellenlänge in nm
LB	Luria Bertani (Medium)
LTTR	LysR-ähnlicher transkriptioneller Regulator, „ <i>LysR-type transcriptional regulator</i> “

m	Meter
M	Molar
Mb	Megabase
MBq	Megabequerel
MCS	Multiple Klonierungsstelle, „ <i>multiple cloning site</i> “
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol%	Molprozent
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-propansulfonsäure
M _r	relative molekulare Masse
μ	Mikro
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidiert)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduziert)
Ni ²⁺ -IDA	Nickel-Agarose mit dreizähniem Chelator Imino- diessigsäure
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Agarose mit vierzähniem Chelator Nitrilo- triessigsäure
n	nano
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
ORF	offenes Leseraster, „ <i>open reading frame</i> “
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, „ <i>polymerase chain reaction</i> “
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(dI-dC)	Poly(deoxyinosinat-deoxycytidylat)
p	Pico
RBS	Erkennungs-Bindestelle („ <i>recognition binding site</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure, „ <i>ribonucleic acid</i> “
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute, „ <i>rounds per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
S-Tag	Peptid mit einer Länge von 15 AS zur Affinitäts-Chromatographie von Fusionsproteinen
Strep-Tag	Peptid mit einer Länge von 8 AS zu Affinitäts-Chromatographie von Fusionsproteinen
SDS	Natriumdodecylsulfat, „ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “
sec	Sekunde(n)
Spc	Spectinomycin
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	Citratzyklus, „ <i>tri-carbon acid cycle</i> “
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethan-sulfonat
Tet	Tetracyclin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
Trx-Tag	Thioredoxin-Tag für eine verbesserte Löslichkeit von Fusionsproteinen
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w-HTH	geflügelte Helix-Drehung-Helix, „ <i>winged helix-turn-helix</i> “
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen

X^r	Resistenz gegenüber X
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Die Gattung *Bacillus*

Vibrio subtilis, eines der ersten systematisch klassifizierten Bakterien, wurde 1835 von Ehrenberg erstmals beschrieben. Etwa 40 Jahre später wurde dieser Organismus durch Cohn in *Bacillus subtilis* umbenannt. Das Gram-positive Bakterium gehört zur Familie der *Bacillaceae*, welche sich besonders durch die Fähigkeit der Endosporenbildung auszeichnet. Diese Endosporen weisen eine sehr hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen wie z.B. Hitze oder Trockenheit auf. Sobald geeignetere Wachstumsbedingungen detektiert werden, kann die Spore durch Auskeimung erneut in den vegetativen Zyklus eintreten (Slepecky and Hemphill, 1992).

Die Mitglieder der Gattung *Bacillus* unterscheiden sich von anderen *Bacillaceae* in ihrem Verhalten gegenüber Luftsauerstoff, der Art der Endosporenbildung, der Säurebildung aus Zuckern und ihrem Temperatur- und pH-Optimum. Während Bacilli strikte Aerobier bis fakultative Anerobier sind, leben andere Gattungen wie z.B. *Clostridium* unter mikroaeroben bis strikt anaeroben Bedingungen. Der GC-Gehalt innerhalb der Genome der Bacilli variiert zwischen 32 bis 69 mol%, was die große Heterogenität dieser Gattung widerspiegelt (Priest, 1993; Slepecky and Hemphill, 1992). *B. subtilis* wird der Gruppe II der sechs Gruppen der Gattung *Bacillus* zugeordnet (Priest, 1993). Zu dieser Gruppe gehören aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft auch die humanpathogenen Arten *Bacillus anthracis*, der Milzbranderreger, und *Bacillus cereus*, ein häufiger Verursacher von Lebensmittelvergiftungen. Auch die aus industriellen Gesichtspunkten interessanten Arten *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus licheniformis* lassen sich in diese Gruppe einordnen.

Im Jahre 1958 entdeckte Spizizen die natürliche Kompetenz des *B. subtilis* Stamms 168 (Spizizen, 1958). Diese Entdeckung trug maßgebend zu einer Vielzahl genetischer und molekularbiologischer Untersuchungen bei. Heute gilt *B. subtilis* als Modell-Organismus für andere Gram-positive Bakterien, wie z.B. für die bereits erwähnten humanpathogenen Arten, und ist damit neben *Escherichia coli* der bislang am besten charakterisierte Mikroorganismus. Das Genomsequenzierungsprojekt des *B. subtilis* Stamms 168 wurde im Jahre 1998 abgeschlossen (Kunst *et al.*, 1997). Zur Aktualisierung wurde das Genom im Jahre 2009 resequenziert und

-annotiert, wodurch 171 zusätzliche Gene identifiziert werden konnten (Barbe *et al.*, 2009). Die komplette annotierte DNA-Sequenz kann über die Datenbank GenoList (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList>) abgerufen werden (Lechat *et al.*, 2008). Das Genom von *B. subtilis* hat eine Größe von 4,2 Millionen Basenpaaren und umfasst 4.422 Gene.

B. subtilis erfüllt den GRAS-Status (Generally regarded as safe) und ist daher von großem Interesse für biotechnologische Anwendungen. Es sind z.B. zahlreiche *B. subtilis* Stämme beschrieben, die insgesamt mehr als zwei Dutzend Antibiotika produzieren. Der Großteil dieser sind Peptidantibiotika, die hauptsächlich gegen Gram-positive Bakterien gerichtet sind (Katz and Demain, 1977; Stein, 2005). Des Weiteren ist die Fähigkeit der Gattung *Bacillus* zur Proteinsekretion für viele Industriezweige von besonderem Interesse. Bis dato konnte für jede *Bacillus* Art mindestens ein extrazelluläres Protein nachgewiesen werden. Zu diesen gehören Proteasen, Nukleasen, Phosphatasen, Lipasen, Carbohydrasen, Penicillinasen, Phospholipase C und bakteriolytische Enzyme. Sie finden u.a. Anwendung in der Waschmittel-, Lebensmittel- und Papierindustrie (Debabov, 1982). Auch für die medizinische Forschung, z.B. im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antibiotika-Ziele, ist *B. subtilis* als nicht-pathogener Modellorganismus von Bedeutung, da sich viele grundlegende physiologische Eigenschaften und biochemische Vorgänge ebenfalls in verwandten humanpathogenen Arten konserviert finden.

1.2 Der anaerobe Stoffwechsel von *Bacillus subtilis*

Lange Zeit wurde *B. subtilis* zu den strikt aeroben Bakterien gezählt. Erst im Jahre 1993 fand ein fakultativ anaerobes Wachstum von *B. subtilis* zum ersten Mal Erwähnung in der Literatur (Priest, 1993)

Die Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff ist einer der wichtigsten Wachstumsparameter für *B. subtilis* als fakultativ anaerober Mikroorganismus, da Sauerstoff in der Atmungskette der terminale Elektronenakzeptor und der Energiegewinn während der aeroben Atmung am größten ist. Für *B. subtilis* kann Sauerstoff im Boden zu einem limitierenden Faktor werden, wenn es z.B. durch starken Regen zur Bildung von Regionen kommt, in denen der Boden vollständig mit Wasser gesättigt ist. In solchen Fällen stellt Wasser eine Diffusionsbarriere für Sauerstoff dar (Nakano and Zuber, 1998). Der Metabolismus von *B. subtilis* wird daher laufend entsprechend des vorherrschenden Sauerstoffpartialdrucks reguliert. Hierbei werden Gene des anaer-

roben Stoffwechsels unter aeroben Bedingungen reprimiert (Marino *et al.*, 2001). Unter anaeroben Bedingungen gewinnt *B. subtilis* während der Fermentation weniger Energie als bei der anaeroben Atmung mit einem alternativen Elektronenakzeptor. Deshalb wird die Transkription von für die Fermentation wichtigen Genen nur dann aktiviert, wenn in der Umgebung kein alternativer Elektronenakzeptor vorhanden ist. Es wird also stets die Transkription derjenigen Gene induziert, deren Genprodukte unter den jeweils herrschenden Bedingungen den maximalen Energiegewinn liefern (Marino *et al.*, 2001). Hierfür ist ein fein abgestimmtes Regulationssystem nötig.

Ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff limitiert, muss *B. subtilis* sowohl für eine ausgeglichene Redoxbalance sorgen, als auch alternative anaerobe Wege zur ATP-Synthese finden. Ist in der Umgebung ein alternativer Elektronenakzeptor vorhanden, können ATP und Reduktionsäquivalente während der anaeroben Atmung weiterhin über die Elektronentransportkette gewonnen werden. Liegen in der Umgebung weder Sauerstoff noch ein alternativer Elektronenakzeptor vor, können ATP und Reduktionsäquivalente mittels Substratstufenphosphorylierung im Laufe der Fermentation generiert werden. ATP wird hierbei durch die Übertragung einer Phosphatgruppe eines energiereichen Zwischenprodukts auf ADP gewonnen.

Während der Anaerobiose ist *B. subtilis* also in der Lage, Energie entweder durch anaerobe Atmung oder durch Fermentation zu gewinnen. Als terminaler Elektronenakzeptor bei der anaeroben Atmung dient Nitrat (Glaser *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997). Ist dieses vorhanden, führt *B. subtilis* eine Nitratatmung durch, die Teil der Ammonifikation ist. Hierbei wird Nitrat durch die membrangebundene dissimilatorische Nitratreduktase NarGHJI zu Nitrit reduziert (Abb. 1). Dieses wird anschließend durch die cytoplasmatische Nitritreduktase NasDE zu Ammonium reduziert (Glaser *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1995; Abb. 1). Durch die Verlagerung von Protonen über die Membran nach außen und deren Rückführung über eine F_0F_1 -ATPase wird dabei ATP generiert.

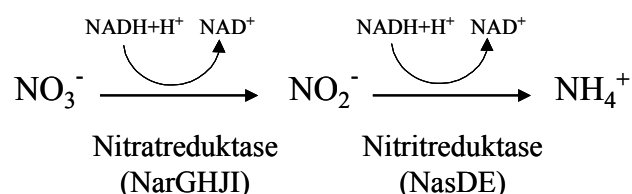


Abb. 1 Ammonifikation in *B. subtilis*. Nitrat (NO_3^-) wird durch die membrangebundene dissimilatorische Nitratreduktase NarGHJI zu Nitrit (NO_2^-) reduziert. Dieses wird anschließend durch die cytoplasmatische Nitritreduktase NasDE zu Ammonium (NH_4^+) reduziert. Bei beiden Reaktionen findet eine Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ statt.

In Abwesenheit eines exogenen Elektronenakzeptors fermentiert *B. subtilis*, wobei als Hauptprodukte der Fermentation Lactat, Acetat, Acetoin, 2,3-Butandiol und Ethanol zu finden sind (Nakano *et al.*, 1997; Abb. 2). Eine Schlüsselrolle bei der Fermentation von *B. subtilis* besitzt die Pyruvatdehydrogenase (PdhABCD) (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). Dies steht im Gegensatz zu *E. coli*, bei welchem die Synthese der Pyruvatdehydrogenase unter fermentativen Bedingungen reprimiert ist. So wird Pyruvat während der Fermentation bei *E. coli* von der Pyruvat-Formiat-Lyase ohne Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Acetyl-CoA umgesetzt, wodurch das Redoxgleichgewicht erhalten bleibt (Hansen and Henning, 1966; Yamamoto and Ishimoto, 1975). Da *B. subtilis* keine Pyruvat-Formiat-Lyase besitzt, wird Pyruvat auch unter fermentativen Bedingungen durch die Pyruvatdehydrogenase unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Acetyl-CoA umgesetzt. Die essentielle Rolle der Pyruvatdehydrogenase für die Fermentation von *B. subtilis* wurde bereits dadurch gezeigt, dass in einer Pyruvatdehydrogenase-Mutante keinerlei Fermentationsprodukte nachweisbar sind (Nakano *et al.*, 1997).

Die Schlüsselvorgänge bei allen Fermentationsprozessen sind die Synthese von ATP und die Reoxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$, welches während der Glykolyse gebildet wird. Bei der gemischten Säure-Butandiol-Fermentation von *B. subtilis* findet dies bei der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat durch die Lactatdehydrogenase (Ldh) statt (Abb. 2). Eine weitere Regeneration von NAD^+ erfolgt bei der Umwandlung von Acetoin zu 2,3-Butandiol. Für die Bildung des neutralen Fermentationsprodukts Acetoin werden zunächst zwei Moleküle Pyruvat durch die α -Acetolactatsynthase (AlsS) zu Acetolactat kondensiert, welches anschließend durch die α -Acetolactat-decarboxylase (AlsD) zu Acetoin decarboxyliert wird. Dieses wird dann durch die Acetoinreduktase/2,3-Butandioldehydrogenase (Ar/BdhA) zu 2,3-Butandiol umgesetzt. Das Gen, das für dieses Enzym kodiert, war lange Zeit unbekannt und konnte erst vor Kurzem identifiziert werden (Nicholson, 2008). Auch bei der Bildung von Acetaldehyd aus Acetyl-CoA durch die Acetaldehyddehydrogenase und der darauf folgenden Bildung von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase wird jeweils ein NAD^+ regeneriert. Jedoch wird bei der Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase oder aus Acetoin durch die Acetoindehydrogenase (AcoABC) jeweils ein Molekül NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Netto ergibt sich somit also die Regeneration von zwei Mol NAD^+ pro Mol Pyruvat (Abb. 2).

Der einzige Schritt bei der Fermentation von *B. subtilis* bei dem Energie in Form von ATP gewonnen werden kann, ist die Synthese von Acetat aus Acetylphosphat durch die Acetatkinase (AckA). Diese überträgt den Phosphatrest von Acetylphosphat auf ADP und generiert so ein Mol ATP pro Mol Pyruvat (Abb. 2).

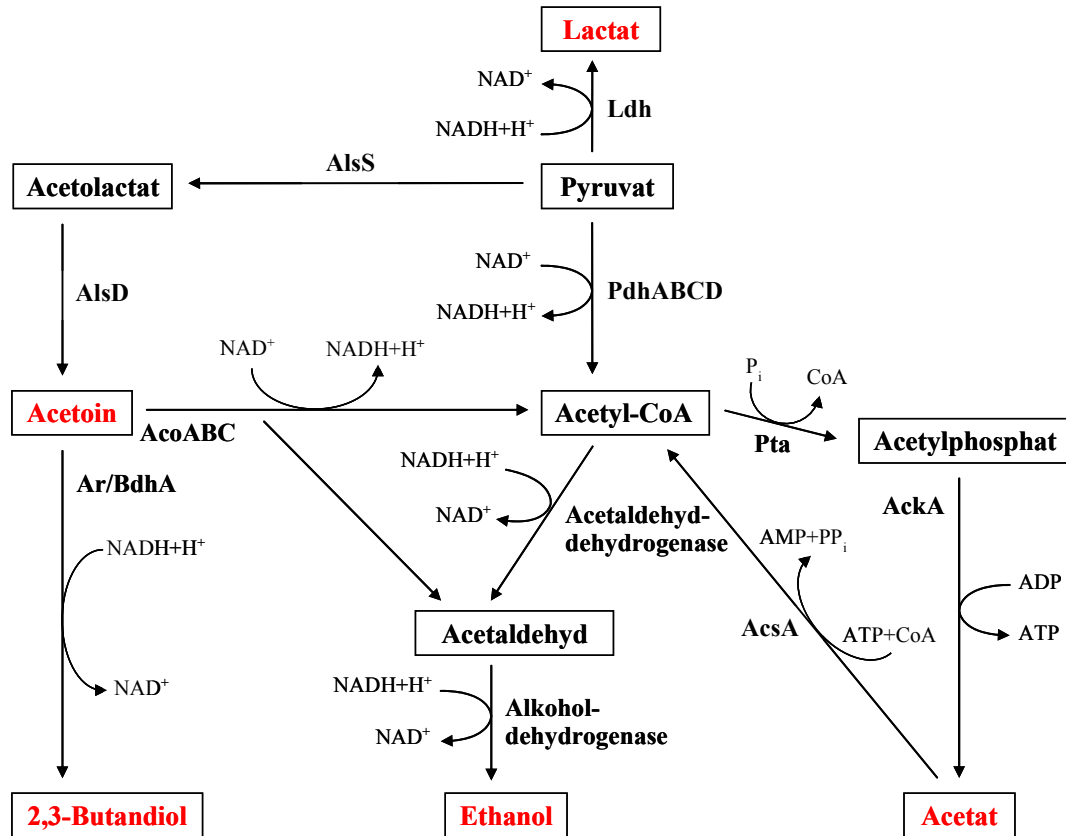


Abb. 2 Anaerober Fermentationsstoffwechsel in *Bacillus subtilis* (verändert nach Cruz Ramos *et al.*, 2000). Enzyme, deren kodierende Gene bereits bekannt sind, sind mit ihren abgekürzten Namen angegeben: Acetatkinase (AckA), Acetoindehydrogenase (AcoABC), α -Acetolactatsynthase (AlsS), α -Acetolactatdecarboxylase (AlsD), Acetyl-CoA Synthase (AcsA), 2,3-Butandioldehydrogenase (Ar/BdhA), Lactatdehydrogenase (Ldh), Phosphotransacetylase (Pta) und Pyruvatdehydrogenase (PdhABCD).

Acetat wird von *B. subtilis* nicht nur während der Fermentation synthetisiert, sondern auch unter aeroben Wachstumsbedingungen als Teil des sogenannten „overflow“ Metabolismus. Dieser „overflow“ Metabolismus findet dann statt, wenn ein Überschuss an Glukose vorhanden ist, so dass allein durch die Glykolyse genügend oder sogar ein Überschuss an ATP gewonnen werden kann. Somit bestehen weder die Kapazität noch die Notwendigkeit, eine komplette Oxidation der überschüssigen Glukose via den TCA-Zyklus durchzuführen. So kommt es zur Sezernierung von nicht vollständig oxidierten Intermediaten (Tobisch *et al.*, 1999). Pyruvat- und Acetyl-CoA-Moleküle, die nicht in den TCA-Zyklus eingeführt werden, werden dann zu einem großen Teil in schwache organische Säuren, also

Acetat und Lactat, umgewandelt und aus der Zelle transportiert (Fuhrer *et al.*, 2005; Tobisch *et al.*, 1999).

Ebenso wie Acetat wird Acetoin von *B. subtilis* nicht ausschließlich unter fermentativen Wachstumsbedingungen synthetisiert. Es wird auch unter aeroben Bedingungen in der späten exponentiellen Wachstumsphase bzw. der Stationärphase gebildet und von der Zelle ins umgebende Medium sezerniert (Renna *et al.*, 1993). Später in der Stationärphase, wenn die Glukose vollständig verbraucht ist, kann es von der Zelle wieder aufgenommen und metabolisiert werden, so dass Acetoin als Kohlenstoffreserve bezeichnet werden kann (Lopez *et al.*, 1975; Speck and Freese, 1973). In die Zelle wieder aufgenommenes Acetoin kann dann über die Acetoindehydrogenase (AcoABCL), die vom *acoABCL* Operon kodiert wird, unter NAD⁺-Verbrauch zu Acetyl-CoA umgesetzt werden (Abb. 2). Dieses kann dann durch die Phosphotransacetylase und Acetatkinase zu Acetat umgewandelt werden, wobei die Zelle ein ATP als Energieausbeute gewinnt (Abb. 2).

Es wurde bereits postuliert, dass durch die Sekretion von Acetoin als neutrale Verbindung der pH-Wert der Umgebung nicht beeinflusst wird. Infolgedessen erfolgt keine Ansäuerung der Umgebung (Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Speck and Freese, 1973). Des Weiteren wurde ebenfalls postuliert, dass die Synthese von Acetoin und seine weitere Umwandlung zu 2,3-Butandiol statt der weiteren Produktion von Acetat und Lactat eine Möglichkeit ist, den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten (Holtzclaw and Chapman, 1975).

1.3 Die Regulation der Anaerobiose in *Bacillus subtilis*

Eine zentrale Rolle in der Regulation des anaeroben Stoffwechsels von *B. subtilis* spielt das Zweikomponentensystem ResDE. Es besteht aus der membrangebundenen Sensorkinase ResE und dem cytoplasmatischen Antwort-Regulator ResD, welcher eine Vielzahl an Zielgenen reguliert. ResDE ist nicht nur an der Regulation von Genen des anaeroben, sondern auch an der Regulation von Genen des aeroben Stoffwechsels beteiligt. Hier sind z.B. die Gene *resA* und *ctaA* zu nennen, deren Genprodukte an der Synthese von HämA beteiligt sind (Sun *et al.*, 1996). Auch einige an der Sporulation von *B. subtilis* beteiligte Gene werden durch ResDE reguliert (Sun *et al.*, 1996).

Durch Expressionsanalysen mittels Microarrays wurde bereits gezeigt, dass ResDE die Transkription von ungefähr 50 Genen unter anaeroben Wachstumsbedingungen

beeinflusst (Ye *et al.*, 2000). ResE kann auf bislang unbekannte Weise den reduzierten Sauerstoffpartialdruck messen. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Messung des Signals „Sauerstoffmangel“ über den reduzierten Elektronenfluss der Atmungskette, also über den Redoxzustand von Menaquinon (Geng *et al.*, 2007). Aufgrund von Mutationsanalysen von ResE wurde postuliert, dass eine cytoplasmatische PAS-Domäne und eventuell zusätzlich eine extrazelluläre Domäne von ResE an der Signalaufnahme beteiligt sind (Baruah *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus bedarf weiterer Aufklärung. Nach Signalaufnahme wird ResE an einem konservierten Histidin-Rest autophosphoryliert. So aktiviertes ResE überträgt den Phosphatrest auf den Antwort-Regulator ResD, welcher dadurch aktiviert wird. Phosphoryliertes ResD induziert die Expression des *nasDE* Operons, dessen Produkt die cytoplasmatische Nitritreduktase ist, des *ldh-lctP* Operons, welches für die Lactatdehydrogenase und Lactatpermease kodiert, und des Gens *fnr*, dessen Produkt der Redoxregulator Fnr ist (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Geng *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2000). Der cytoplasmatische Redoxregulator Fnr von *B. subtilis* bildet bei reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit ein sauerstofflabiles Eisen-Schwefel-Zentrum aus und kann darüber den Sauerstoffpartialdruck in der Zelle messen. Nur mit intaktem Eisen-Schwefel-Zentrum kann Fnr die Transkription seiner Zielgene aktivieren. In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Eisen-Schwefel-Zentrum oxidiert und Fnr somit inaktiviert (Reents *et al.*, 2006a). Fnr mit intaktem Eisen-Schwefel-Zentrum aktiviert die Expression des *narGHJI* Operons, welches für die Nitratreduktase kodiert, und des *narK-fnr* Operons. Das Gen *narK* kodiert für einen Nitrittransporter (Cruz Ramos *et al.*, 1995). Da *narK* und *fnr* zusammen in einem Operon vorliegen, induziert Fnr somit auch die Expression seines eigenen Gens (Abb. 3). Zusätzlich wird von Fnr die Expression des Gens *arfM* induziert (Reents *et al.*, 2006b). Dieses kodiert für den Modulator der anaeroben Atmung und Fermentation. ArfM verstärkt die Expression des *ldh-lctP* Operons, des *alsSD* Operons, welches für die α -Acetolactatsynthase und -decarboxylase kodiert, und des *nasDE* Operons (Marino *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2001; Abb. 3). Unter Bedingungen mit einem hohen NAD^+/NADH -Verhältnis reprimiert der transkriptionelle Repressor Rex die Expression des *ldh-lctP* Operons und des Gens *ywcJ*, welches für einen potentiellen Nitrittransporter kodiert (Larsson *et al.*, 2005).

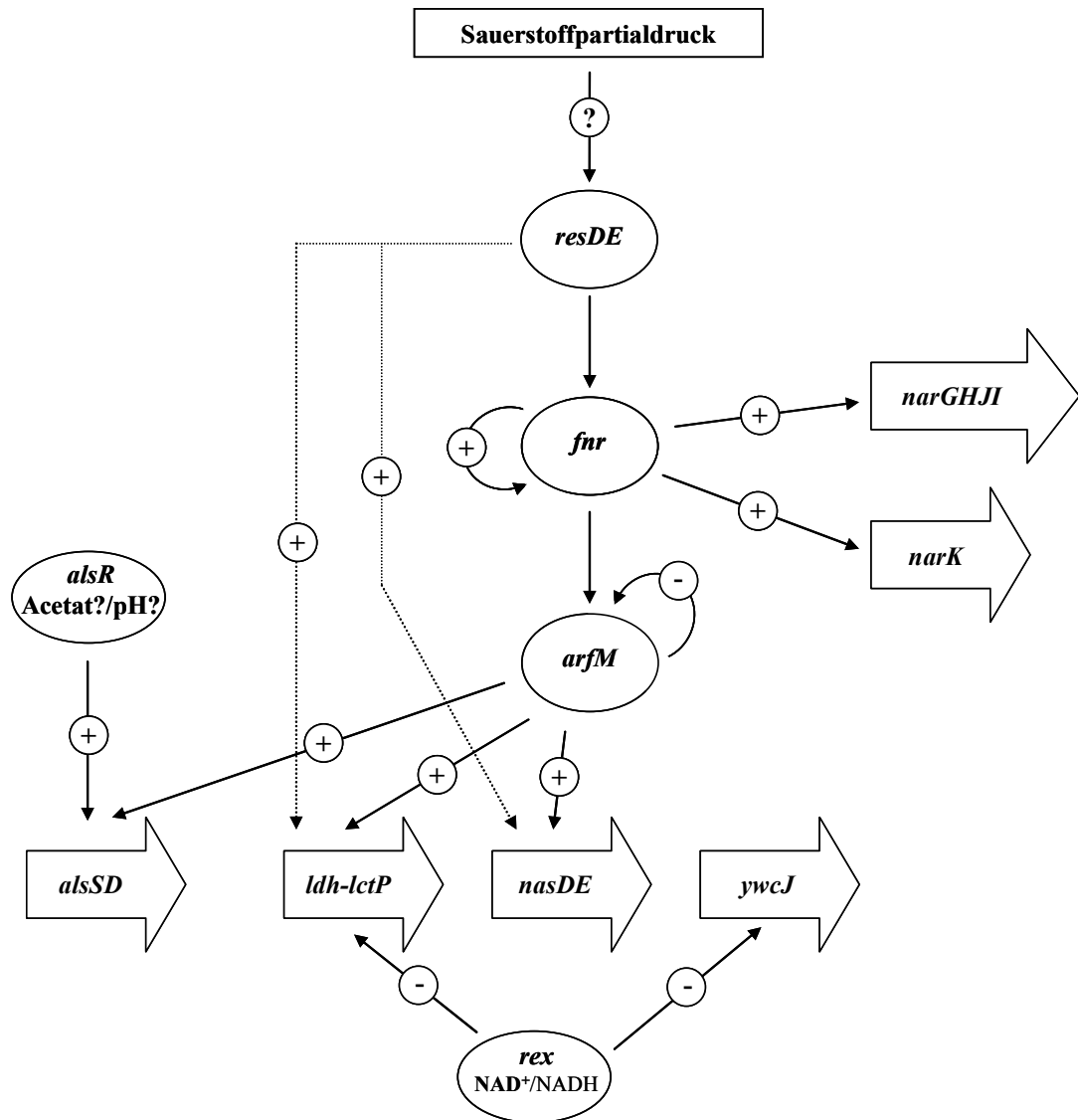


Abb. 3 Modell zur Regulation der Anaerobiose in *Bacillus subtilis*. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck phosphoryliert die Sensorkinase ResE den Response-Regulator ResD. Dieser induziert daraufhin die Expression des Gens *fnr*. *Fnr* zeigt eine positive Autoregulation und induziert die Transkription von *narGHJI*, *narK* und *arfM*. *ArfM* verstärkt die Expression der Operons *alsSD*, *ldh-lctP* und *nasDE* und zeigt eine negative Autoregulation. *Rex* inhibiert bei hohem NAD⁺/NADH-Verhältnis die Expression des *ldh-lctP* Operons und des Gens *ywcJ*. *AlsR* induziert die Transkription des *alsSD* Operons. Für seine transkriptionelle Aktivität benötigt *AlsR* einen Effektor. Hierfür wurden bereits Acetat oder ein niedriger pH-Wert postuliert (Renna *et al.*, 1993).

Auffällig ist, dass die anaerobe Expression des *alsSD* Operons, welches für Enzyme der Acetoinbiosynthese kodiert, nicht von einem der bekannten Regulatoren des anaeroben Stoffwechsels, also *ResE*, *Fnr* oder *Rex*, reguliert wird. Es ist bereits gezeigt worden, dass der transkriptionelle Regulator *AlsR*, der für die aerobe *alsSD* Expression in der Stationärphase und in der Gegenwart von Acetat verantwortlich ist, auch für die *alsSD* Expression unter anaeroben Bedingungen benötigt wird (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Holtzclaw and Chapman, 1975; Renna *et al.*, 1993; Abb. 3). Es wurde weiterhin beschrieben, dass *AlsR* ebenfalls für die Expression des *ldh-lctP*

Operons unter anaeroben Wachstumsbedingungen essentiell ist (Cruz Ramos *et al.*, 2000).

1.4 Die Regulation der Acetoinbiosynthese in *Bacillus subtilis*

Das *alsSD* Operon kodiert für die Enzyme α -Acetolactatsynthase (*alsS*) und -decarboxylase (*alsD*), welche für die Biosynthese von Acetoin in *B. subtilis* verantwortlich sind. Dabei kondensiert die α -Acetolactatsynthase (AlsS) zwei Moleküle Pyruvat zu einem Molekül Acetolactat. Dieses wird dann durch die α -Acetolactat-decarboxylase (AlsD) zu Acetoin decarboxyliert.

Die Expression des *alsSD* Operons ist nicht nur unter anaeroben Wachstumsbedingungen induziert. Auch unter aeroben Wachstumsbedingungen wurde in der Stationärphase eine verstärkte *alsSD* Expression gezeigt (Renna *et al.*, 1993). Zusätzlich führte unter aeroben Bedingungen die Zugabe von Acetat zum Medium in der exponentiellen Wachstumsphase zu einer Induktion der *alsSD* Expression (Renna *et al.*, 1993). Bei *B. licheniformis* wurde durch Transkriptom-Analysen eine pH-abhängige Expression des *alsSD* Operons beobachtet (Turinsky *et al.*, 2000). Verantwortlich für die Induktion der *alsSD* Expression in *B. subtilis* unter fermentativen Wachstumsbedingungen, in der aeroben exponentiellen Wachstumsphase mit Zugabe von Acetat, sowie in der aeroben Stationärphase ist der Regulator AlsR, der zur Familie der LysR-ähnlichen transkriptionellen Regulatoren gehört.

Die *alsSD* Expression in *B. subtilis* wurde bereits mit einer *alsS-lacZ* Reportergenfusion im *B. subtilis* Stamm HRB7 untersucht (March, 2005). Die Promotorlänge der Reportergenfusion betrug hierbei 341 bp und war ausreichend für eine volle Induktion der *alsS-lacZ* Expression. Eine fermentative Inkubation der Zellen führte im Vergleich zu aeroben Wachstumsbedingungen zu einer 13fachen Induktion der *alsS-lacZ* Expression. Diese konnte durch Zugabe von 40 mM Acetat zum Medium nochmals um den Faktor 2,5 gesteigert werden (Tab.1). Erreichten auf diese Weise kultivierte Zellen die Stationärphase, erfolgte eine nochmalige Induktion der *alsS-lacZ* Expression um den Faktor 2,2 (Tab. 1). Insgesamt war die *alsSD* Expression in fermentativ mit 40 mM Acetat kultivierten Zellen, die sich in der Stationärphase befanden, verglichen mit aerob kultivierten Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase um den Faktor 73 verstärkt (March, 2005).

Tab. 1 Die Expression einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Der *Bacillus subtilis* Stamm HRB7 wurde unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen sowie fermentativen Wachstumsbedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat in SMM-Medium kultiviert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde in der exponentiellen Wachstumsphase sowie für fermentativ mit Acetat kultivierte Zellen zusätzlich in der stationären Wachstumsphase bestimmt. Die Daten repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Wachstumsbedingung	β -Galaktosidaseaktivität [Miller-Units]
aerob, exponentiell	35 ± 3
fermentativ, exponentiell	467 ± 92
fermentativ + 40 mM Acetat, exponentiell	1150 ± 176
fermentativ + 40 mM Acetat, stationär	2558 ± 251

Es konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Faktoren, die auf die Expression der *alsS-lacZ* Reporterengenfusion induzierend wirkten, additiv verhielten. Auch die Reduktion des externen pH-Werts führte sowohl unter aeroben als auch unter fermentativen Wachstumsbedingungen zu einer induzierten *alsS-lacZ* Expression. Die Expression des *alsSD* Operons wird also von einer Vielzahl externer Wachstumsparameter beeinflusst.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die *alsSD* Expression unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen, mit und ohne Acetat sowie bei reduziertem externen pH-Wert zu jeder Wachstumsphase strikt *alsR*-abhängig war, da in einer *alsR* Mutante keinerlei *alsS-lacZ* Aktivität detektierbar war (March, 2005). Durch sukzessive Promotorverkürzungen konnte der regulatorische Bereich des *alsSD* Promotors auf den Bereich innerhalb der ersten 86 Basen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt eingegrenzt werden (March, 2005).

1.5 Der Transkriptionsregulator AlsR aus *Bacillus subtilis*

Das *alsSD* Operon wird in *B. subtilis* auf transkriptioneller Ebene durch den Transkriptionsregulator AlsR, der vom *alsR* Gen kodiert wird, reguliert (Renna *et al.*, 1993). Das Gen *alsR* liegt in direkter Nachbarschaft zum *alsSD* Operon auf dem Gegenstrang der DNA und wird divergent transkribiert (Abb. 4). Aufgrund dieser genomischen Organisation überlappen sich die Promotorbereiche des *alsR* Gens und des *alsSD* Operons zum Teil (Abb. 4). Eine solche genomische Organisation ist ein typisches Merkmal für Mitglieder der LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren, zu der AlsR gezählt wird.

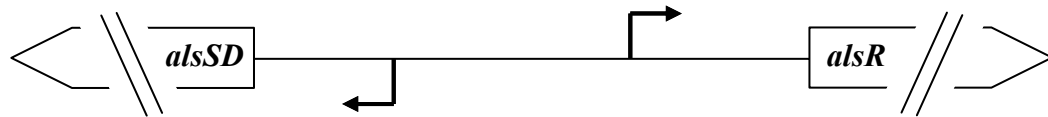


Abb. 4 Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *alsSD* Operons und des *alsR* Gens. Das *alsSD* Operon kodiert für die α -Acetolactatsynthase und -decarboxylase und ist auf dem Minus-Strang des *B. subtilis* Chromosoms lokalisiert. Der Regulator AlsR wird vom *alsR* Gen kodiert, welches auf dem Plus-Strang liegt und somit divergent zum *alsSD* Operon transkribiert wird. Die Pfeile geben die Positionen der Transkriptionsstartpunkte an (für *alsR* ist der Transkriptionsstartpunkt nicht bekannt).

Das Protein AlsR besitzt eine N-terminale „winged“ Helix-turn-Helix DNA-Bindedomäne (wHTH) sowie eine C-terminale Effektorbindedomäne und somit eine typische Struktur von LysR-ähnlichen Transkriptionsfaktoren. Acetat wurde als Effektor für AlsR postuliert, da die Zugabe von Acetat zum Wachstumsmedium die Expression des *alsSD* Operons induziert (Renna *et al.*, 1993).

1.5.1 Die LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren (LTTR)

Der Namensgeber der LysR-Familie ist der transkriptionelle Aktivator LysR aus *E. coli*. Er aktiviert die Expression des *lysA* Gens, dessen Genprodukt, die Diaminopimelat-Decarboxylase, Diaminopimelat zu Lysin decarboxyliert (Stragier and Patte, 1983; Stragier *et al.*, 1983). Die LysR-Familie transkriptioneller Regulatoren („*LysR-type transcriptional regulator*“, LTTR) wurde erstmals im Jahr 1988 beschrieben, als neun funktionell ähnliche transkriptionelle Regulatorproteine aufgrund von Aminosäure-Sequenzhomologien als eine verwandte Gruppe bakterieller Regulatoren unterschieden werden konnten (Henikoff *et al.*, 1988). Zu diesem Zeitpunkt wurden LTTRs als negativ autoregulierte transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren eines einzelnen divergent transkribierten Gens beschrieben, die für ihre Aktivität einen Effektor benötigen (Lindquist *et al.*, 1989; Schell, 1993). Weiterführende Untersuchungen haben jedoch dazu geführt, dass LTTRs heute als globale transkriptionelle Regulatoren betrachtet werden, die ein einzelnes Gen, ein Operon oder ein mehrere Regulationseinheiten umfassendes Regulon regulieren können. Dabei werden sie oft divergent vom entsprechenden Gen oder Operon transkribiert, können jedoch auch an einer anderen Stelle des Genoms lokalisiert sein (Maddocks and Oyston, 2008). Sofern ein LTTR divergent von seinem Zielgen oder -operon transkribiert wird, befinden sich zwischen dem Transkriptionsstartpunkt des LTTRs und dem der Ziel-DNA zwischen 25 und 70 bp (Schell, 1993). Der Promotor

des Regulators überlappt also stark mit dem des Zielgens oder -operons. Durch diese Organisation erfolgt oft eine negative Autoregulation des Regulators.

Durch Homologievergleiche der abgeleiteten AS-Sequenzen potentieller Regulatoren konnten bislang über 800 potentielle LTTRs identifiziert werden, was sie zur größten Familie DNA-bindender Proteine im Reich der Prokaryoten macht (Maddocks and Oyston, 2008; Schell, 1993). Mitglieder dieser Familie sind sowohl in α -, β - und γ -Proteobakterien als auch in Gram-positiven Bakterien zu finden, außerdem existieren funktionelle Orthologe in Archaea und Eukaryoten (Maddocks and Oyston, 2008).

Die Funktionen der von LTTRs regulierten Gene und Operons sind sehr unterschiedlich. Ihre Produkte sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. So reguliert BenM aus *Acinetobacter* sp. Stamm ADP1 zwei Operons und ein Gen, deren Produkte Benzoat und Catechol degradieren (Collier *et al.*, 1998). *In vitro* Transkriptions-Analysen haben gezeigt, dass BenM in Anwesenheit seiner zwei Effektoren Muconat und Benzoat eine maximale Transaktivierung seiner Zielgene zeigt (Bundy *et al.*, 2002). CbnR aus *Ralstonia eutropha* reguliert abhängig von seinem Effektor Muconat die Expression des *cbnABCD* Operons, dessen Genprodukte für die Degradation von Chlorocatechol verantwortlich sind (Ogawa *et al.*, 1999). In *E. coli* reguliert OxyR die Expression des Peroxid-Stimulons, dessen Produkte oxidativen Stress in Form von H_2O_2 eliminieren (Farr and Kogoma, 1991). Die Aktivierung von OxyR erfolgt nicht über einen Effektor, sondern durch Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Proteins durch Oxidation (Zheng *et al.*, 1998). CysB aus *Klebsiella aerogenes* reguliert die Expression von verschiedenen Genen, deren Produkte für die Biosynthese von Cystein verantwortlich sind (Kredich, 1992). Der Effektor von CysB ist N-Acetylserin (Jovanovic *et al.*, 2003).

Nicht für alle LTTRs konnten bislang die zugehörigen Effektoren identifiziert werden. Für BlaA aus *Streptomyces* spp. ist der Effektor beispielsweise bislang nicht bekannt. BlaA reguliert zwei Gene, *blaL* und *blaU*, die jeweils für eine β -Lactamase kodieren und somit für eine Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika verantwortlich sind (Raskin *et al.*, 2003). Auch für YofA aus *B. subtilis* ist der Effektor bislang nicht identifiziert worden. YofA reguliert die Expression des Gens *ftsW*, dessen Genprodukt für die Zellteilung essentiell ist (Lu *et al.*, 2007).

Dies sind nur einige Beispiele für LTTRs, ihre Effektoren und die Funktionen der von ihnen regulierten Gene.

Die Familie der LTTRs besitzt strukturell viele Gemeinsamkeiten. Alle bekannten Mitglieder der LTTR-Familie besitzen mit 300 bis 350 Aminosäureresten eine vergleichbare Größe. N-terminal ist jeweils eine „winged“ Helix-turn-Helix DNA-Bindedomäne (wHTH) lokalisiert (Abb. 5). Die Bindung des Effektors erfolgt im C-terminalen Bereich des Proteins, in welchem zwei regulatorische Domänen die Effektorbindestelle flankieren und mit ihr zusammen die Effektorbindedomäne bilden (Abb. 5). Die Effektorbindedomäne kann in ihrer Größe innerhalb der LTTRs variieren. Die N-terminale wHTH DNA-Bindedomäne ist durch eine Linker-Helix mit der C-terminalen Effektorbindedomäne verbunden (Abb. 5).

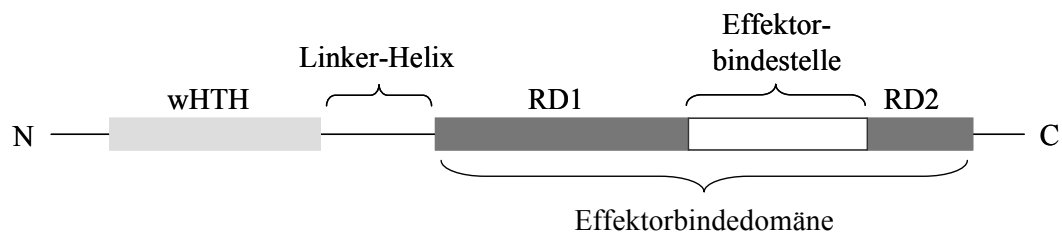


Abb. 5 Schematische Darstellung der einzelnen Domänen eines LTTRs (verändert nach Maddocks and Oyston, 2008). Die hellgraue Box repräsentiert die N-terminale „winged“ Helix-turn-Helix-Domäne (wHTH). Die dunkelgrauen Boxen stellen die C-terminalen regulatorischen Domänen 1 und 2 (RD1 und RD2) dar. Zwischen diesen befindet sich die Effektorbindestelle. Die wHTH DNA-Bindedomäne ist durch eine Linker-Helix mit der Effektorbindedomäne verbunden.

Die ersten 66 Aminosäurereste, in denen sich die wHTH DNA-Bindedomäne befindet, sind in allen LTTRs hoch konserviert. Hierbei weisen die zentralen Aminosäuren an den Positionen 23 bis 42 mit einer nahezu 40%igen Identität eine starke Homologie auf (Schell, 1993). Eine klassische HTH DNA-Bindedomäne besteht aus den drei Helices H1, H2 und H3 (Aravind *et al.*, 2005) (Abb. 6).

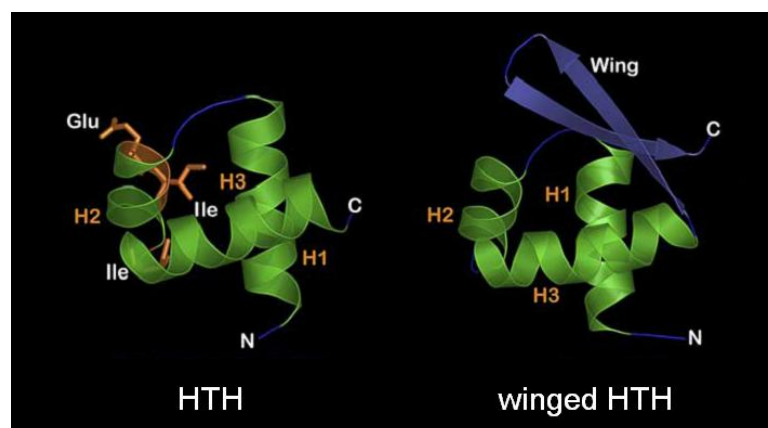


Abb. 6 Struktur einer klassischen HTH DNA-Bindedomäne und einer winged-HTH DNA-Bindedomäne (Aravind *et al.*, 2005). Helices sind grün dargestellt und mit einem „H“ markiert, β-Faltblattstrukturen sind blau dargestellt. Die klassische HTH DNA-Bindedomäne besteht aus den drei Helices H1, H2 und H3. Der „turn“ befindet sich zwischen den Helices H2 und H3. Die „winged“ HTH DNA-Bindedomäne hat zusätzlich eine antiparallele β-Faltblattstruktur, die in der Abbildung mit „Wing“ gekennzeichnet ist.

Die erste Helix eines HTH-Motivs übernimmt hauptsächlich eine stabilisierende Funktion. Die zweite und dritte Helix sind durch eine Aminosäuresequenz ohne definierte Struktur, den „turn“, miteinander verbunden und interagieren mit der DNA (Abb. 6). Hierbei wird die dritte Helix als so genannte Erkennungshelix in die große Furche der DNA eingebracht (Aravind *et al.*, 2005). Die wHTH DNA-Bindedomäne der LTTRs unterscheidet sich von der klassischen HTH DNA-Bindedomäne durch eine antiparallele β -Faltblatt-Haarnadelstruktur am C-terminalen Ende des HTH-Motivs (Aravind *et al.*, 2005) (Abb. 6). Dieser so genannte „wing“ interagiert meist mit der kleinen Furche der DNA und stellt somit eine zusätzliche Protein-DNA Interaktionsstelle dar (Aravind *et al.*, 2005).

LTTRs binden an Regionen in den Promotoren ihrer Zielgene und/oder -operons, die reich an den Basen Adenin (A) und Thymin (T) sind. Hierbei erfolgt die Bindung an eine Konsensus-Sequenz mit der Basenabfolge T-N₁₁-A, die sich um den Bereich an Position -65 in Bezug auf den jeweiligen Transkriptionsstartpunkt des Zielgens oder -operons befindet (Maddocks and Oyston, 2008; Schell, 1993). Diese Sequenzabfolge wird als Erkennungsbindestelle („*recognition binding site*“, RBS) bezeichnet (Schell, 1993). In den Promotoren der Zielgene oder -operons befindet sich in der jeweiligen -35 Region meist eine weitere Stelle, an die der Regulator bindet. Es wurde postuliert, dass eine Bindung an diese „*activating binding site*“ (ABS) jedoch nur in Anwesenheit des jeweiligen Effektors erfolgt (Schell, 1993). Einem Modell zufolge könnte ein LTTR-Dimer effektorunabhängig an die RBS binden. Ein zweites Dimer könnte dann effektorabhängig an das erste Dimer binden, und daraufhin durch eine Konformationsänderung mit der ABS interagieren (McFall *et al.*, 1998). Ein weiteres Modell besagt, dass ein LTTR-Tetramer bereits ohne Anwesenheit des Effektors sowohl an die RBS als auch an die ABS bindet. Eine Effektorbindung könnte dann zu einer Konformationsänderung des Tetramers und damit zu seiner Aktivierung führen (Tropel and van der Meer, 2004).

In den meisten Fällen liegen LTTRs als Tetramere vor (Maddocks and Oyston, 2008). Dies wurde für einige LTTRs bereits experimentell bestätigt. Beispielsweise wurde für HlyT aus *Vibrio cholerae*, BenM aus *Acinetobacter* sp. ADP1, und OxyR aus *E. coli* per Gelfiltration gezeigt, dass sie sich als Tetramere in Lösung befinden (Bundy *et al.*, 2002; Kulik *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 2009). Durch Kristallisation und Gelfiltration wurde gezeigt, dass DntR aus *Burkholderia* sp. Stamm DNT und CbnR aus *R. eutropha* ebenfalls als Tetramere vorliegen (Muraoka

et al., 2003a; Smirnova *et al.*, 2004). Auch CysB aus *K. aerogenes* ist in seiner funktionellen Form ein Tetramer, obwohl bislang kristallisierte N-terminal verkürzte Formen Dimere waren (Lynch *et al.*, 1994; Tyrrell *et al.*, 1997).

Der C-terminale Bereich der LTTRs ist weit weniger konserviert als die wHTH DNA-Bindedomäne am N-Terminus und ist mit dieser über eine Linker-Helix verbunden. In der C-terminalen Effektorbindedomäne ist die Effektorbindestelle lokalisiert. Der geringe Grad an Konservierung in diesem Bereich ist wahrscheinlich darin begründet, dass verschiedene LTTRs verschiedene Effektoren und somit auch zugehörige unterschiedliche Effektorbindedomänen für ihre Aktivität benötigen. Die Bindung eines Effektormoleküls an die Effektorbindestelle eines LTTRs führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung, die die Transkription des Zielgens oder -operons ermöglicht (Maddocks and Oyston, 2008). Für OxyR aus *E. coli* wurde durch Kristallstrukturen der Effektorbindedomäne gezeigt, dass die oxidationsbedingte Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten eine Änderung der Konformation dieser Bindedomäne bewirkt (Choi *et al.*, 2001). Auch für BenM aus *Acetobacter* sp. ADP1 wurde durch Kristallisation der Effektorbindedomäne gezeigt, dass durch Bindung der beiden Effektoren Muconat und Benzoat eine Konformationsänderung in dieser Domäne erfolgt (Ezezika *et al.*, 2007).

Aufgrund unspezifischer Aggregation ist es meist schwierig, LTTRs in ihrer Gesamtlänge zu produzieren und zu kristallisieren. Von einigen LTTRs wurden N-terminal verkürzte Versionen produziert und kristallisiert, denen die wHTH DNA-Bindedomäne und der Großteil der Linker-Helix fehlten. Dies ist z.B. der Fall für BenM aus *Acinetobacter* sp. ADP1 und OxyR aus *E. coli* (Choi *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004; Ezezika *et al.*, 2007). Auch CysB aus *K. aerogenes* und DntR aus *Burkholderia* sp. Stamm DNT wurden als N-terminal verkürzte Versionen produziert und kristallisiert (Smirnova *et al.*, 2004; Tyrrell *et al.*, 1997). Diese Proteine bildeten meist nur Dimere aus, was darauf hinweist, dass die wHTH DNA-Bindedomäne auch an der Multimerisierung beteiligt sein könnte. Als bislang einziger LTTR konnte CbnR aus *R. eutropha* in seiner vollen Länge kristallisiert und seine Struktur aufgeklärt werden (Muraoka *et al.*, 2003a; Muraoka *et al.*, 2003b). CbnR kristallisierte als Homotetramer in ellipsoider Form. Dabei bildeten jeweils zwei Monomere zur Dimerisierung über die Linker-Helix eine sogenannte „coiled-coil“ Struktur aus, die auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Amino-

säuren der Helices beruht. Die Tetramerisierung erfolgte dann jeweils über die einzelnen Monomere untereinander (Abb. 7).

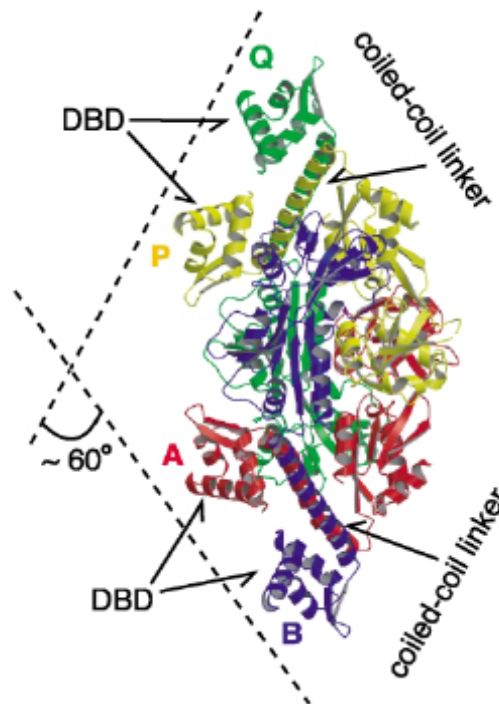


Abb. 7 Kristallstruktur des CbnR Tetramers aus *Ralstonia eutropha* (Muraoka *et al.*, 2003a). Die vier einzelnen Monomere sind in den Farben rot, blau, gelb und grün dargestellt und mit den Buchstaben A, B, P und Q bezeichnet. Die vier wHTH DNA-Bindedomänen (DBD) sind ebenso wie die zwei „coiled-coil“-Linker durch Pfeile markiert.

CbnR konnte bislang nicht zusammen mit seinem Effektormolekül Muconat kristallisiert werden. Um dennoch eine mögliche Effektorbindestelle bestimmen zu können, erfolgte ein Vergleich der C-terminalen Domäne von CbnR mit Kristallstrukturen sowie Mutationsanalysen C-terminaler Domänen anderer LTTRs wie z.B. CysB und OxyR. Aufgrund dieser Vergleiche wurde postuliert, dass sich die Effektor-Bindestelle zwischen der regulatorischen Domäne 1 (RD 1) und 2 (RD 2) eines jeden Monomers (Abb. 8) befindet. RD 1 und RD 2 sind jeweils über einen kurzen „cross-over“ der Aminosäuren 162-163 bzw. 260-264 miteinander verbunden, der zwischen den beiden regulatorischen Domänen ein Gelenk („hinge“) bildet. Dieser „hinge“ kommt als mögliche Effektorbindestelle in Frage (Muraoka *et al.*, 2003a) (Abb. 8).

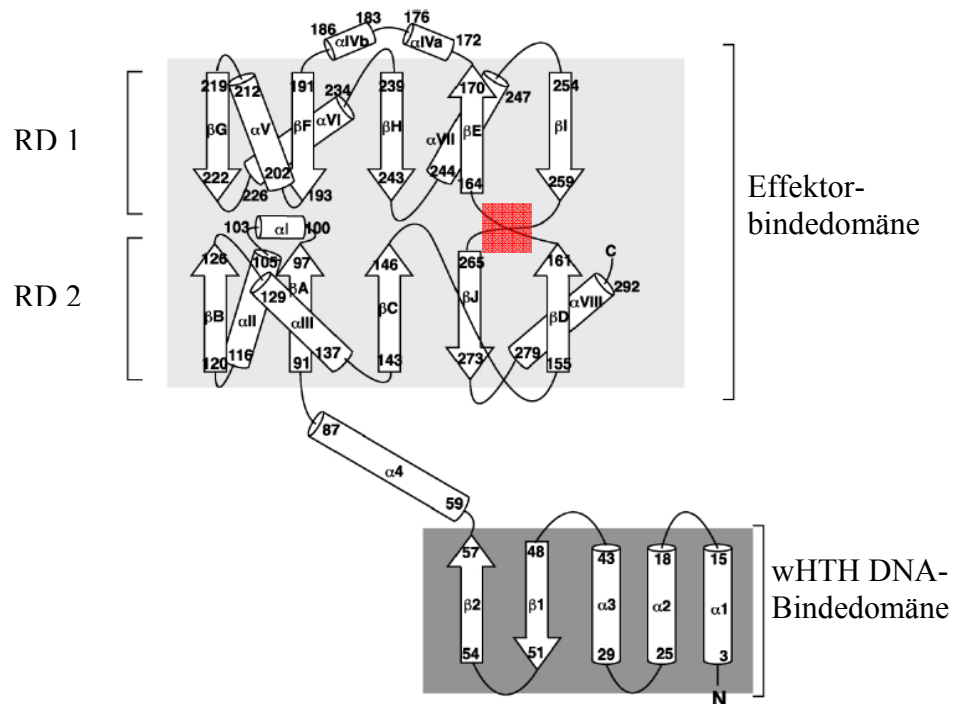


Abb. 8 Schematischer Aufbau eines CbnR-Monomers aus *Ralstonia eutropha* (Muraoka *et al.*, 2003a). Helices sind durch Röhren, β -Faltblätter durch Pfeile gekennzeichnet und jeweils ausgehend vom N-Terminus nummeriert. Die wHTH DNA-Bindedomäne ist durch die Linker-Helix $\alpha 4$ mit der Effektorbindedomäne verbunden, die aus den regulatorischen Domänen 1 und 2 (RD 1 und RD 2) besteht. RD1 und RD2 bestehen jeweils aus 5 β -Faltblättern, die von Helices umgeben sind. Zwischen RD 1 und RD 2 befindet sich eine „cross-over“ Region (rot unterlegt).

Als bislang einziger LTTR, der in seiner vollen Länge kristallisiert und dessen komplette Struktur aufgeklärt werden konnte, dient CbnR somit bislang als Modell für weitere LTTRs. Allerdings gibt es bislang keine Struktur in Anwesenheit des Effektors oder zusammen mit DNA. Daher repräsentiert die Kristallstruktur eine inaktive Form von CbnR, weshalb es lediglich als eingeschränktes Modell für andere LTTRs zu betrachten ist.

1.5.2 Der transkriptionelle Regulator AlsR aus *Bacillus subtilis*

Der LysR-ähnliche transkriptionelle Regulator AlsR aus *B. subtilis* hat eine Länge von 303 Aminosäureresten. Durch Homologievergleiche mit Proteinen der LTTR-Familie kann AlsR in eine N-terminale DNA-Bindedomäne mit einem wHTH-Motiv und eine C-terminale Domäne mit einer potentiellen Effektorbindestelle unterteilt werden.

AlsR-homologe Proteine sind nicht nur in *B. subtilis*, sondern auch bei anderen Mitgliedern der Gattung *Bacillus* zu finden. So z.B. bei *B. amyloliquefaciens* mit einer 76%igen, bei *B. licheniformis* mit einer 64%igen sowie bei *B. thuringiensis*, *B.*

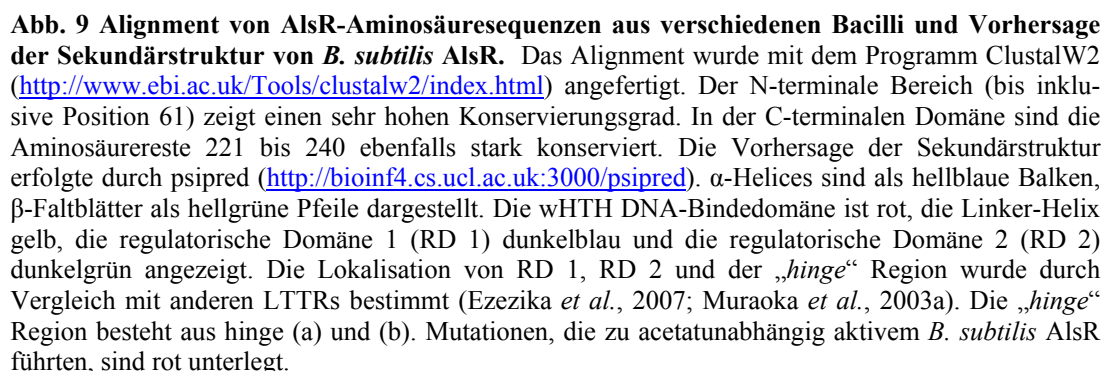
cereus und *B. anthracis* mit einer 54%igen Aminosäuresequenz-Identität (Tab. 2). Die Ähnlichkeit von *B. subtilis* AlsR zu den AlsR Proteinen der in Tab. 2 aufgeführten Bacilli ist in allen Fällen über 79 %. Mit anderen Mitgliedern der Familie der LTTRs weist *B. subtilis* AlsR eine geringere Identität auf. So beträgt die Aminosäuresequenz-Identität zu BenM aus *Acinetobacter* sp. ADP1 36 %, zum Modell-LTTR CbnR aus *R. eutropha* 27 %, zu CysB aus *K. aerogenes* 25 % und zu OxyR aus *E. coli* 26 % (Tab. 2).

Tab. 2 Aminosäuresequenz-Identitäten und -Ähnlichkeiten von AlsR aus *Bacillus subtilis* zu AlsR anderer Bacilli und zu LTTRs aus anderen Organismen.

LysR Transkriptionsregulator	Identität	Ähnlichkeit
AlsR aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	76 %	95 %
AlsR aus <i>Bacillus licheniformis</i>	64 %	88 %
AlsR aus <i>Bacillus thuringiensis</i>	54 %	79 %
AlsR aus <i>Bacillus cereus</i>	54 %	79 %
AlsR aus <i>Bacillus anthracis</i>	54 %	79 %
BenM aus <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	36 %	54 %
CbnR aus <i>Ralstonia eutropha</i>	27 %	49 %
CysB aus <i>Klebsiella aerogenes</i>	25 %	48 %
OxyR aus <i>Escherichia coli</i>	26 %	52 %

Ein Vergleich der AlsR-Aminosäuresequenzen der in Tab. 2 aufgeführten Bacilli zeigt in der N-terminalen Domäne von Position 1 bis 61 im Bereich der wHTH DNA-Bindedomäne einen sehr hohen Konservierungsgrad (Abb. 9). Der weitere Bereich der verschiedenen AlsR Proteinsequenzen ist weniger hoch konserviert. Jedoch zeigt sich an den Positionen 221 bis 240 ein stark konserviertes Motiv (Abb. 9). Dies ist ein Hinweis darauf, dass hier eventuell die Effektorbindestelle oder eine strukturell wichtige Domäne lokalisiert ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein Austausch von Threonin an Position 201 gegen ein Alanin (T201→A) ebenso wie der Austausch von Serin an Position 234 gegen ein Alanin (S234→A) bereits in der aeroben exponentiellen Wachstumsphase zu einer drei- bis fünffach erhöhten Expression des *alsSD* Operons führte (Renna *et al.*, 1993). Diese beiden AlsR-Mutanten sind demnach unabhängig von Acetat als potentiell effektor aktiv. Die mutagenisierten Aminosäuren befinden sich jeweils in einem Bereich des Proteins, in dem der Grad der Konservierung zu AlsR Proteinen anderer Bacilli hoch ist (Abb. 9). Daher besteht die Möglichkeit, dass einer oder



Eine vorhergesagte Sekundärstruktur von AlsR wurde mit Sekundärstrukturen und Kristallstrukturen anderer LTTRs, wie z.B. CbnR und BenM, verglichen (Ezezika *et al.*, 2007; Muraoka *et al.*, 2003a). Die Anordnung der α -Helices und β -Faltblätter in der vorhergesagten AlsR-Sekundärstruktur stimmt zum Großteil mit denen der zum Vergleich herangezogenen Regulatoren überein. Dadurch konnte die potentielle Lokalisation der regulatorischen Domänen 1 und 2 sowie der „hinge“ Region bestimmt werden (Abb. 9). Letztere besteht aus hinge (a) und hinge (b) (Abb. 9). Dies sind die Stellen, an denen sich bei CbnR die „crossover“ Regionen befinden, die die „hinge“ Region bilden (Abb. 8 und 9).

Bislang wurden Acetat oder ein reduzierter pH-Wert als Effektor für AlsR postuliert (Renna *et al.*, 1993). Diese Aussage basiert auf der acetatabhängigen Expression von *alsS-lacZ* Reportergenfusionen (Renna *et al.*, 1993). Bislang wurde *B. subtilis* AlsR jedoch noch nicht rekombinant produziert, weshalb es keinerlei Informationen über seine Struktur und die Identität seines Effektors gibt. Der regulatorische Bereich des *alsSD* Promotors wurde durch sukzessive Promotorverkürzungen auf den Bereich innerhalb der ersten 86 Basen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt eingegrenzt (March, 2005). Mit rekombinant produziertem und gereinigtem AlsR wäre es möglich, durch *in vitro* DNA-Bindungsstudien wie z.B. DNaseI-Protektionsanalysen die AlsR-Bindestelle im *alsSD* Promotor genauer zu definieren. Zur heterologen Produktion von AlsR wurden bereits im Rahmen einer Diplomarbeit verschiedene Expressionssysteme getestet. Dabei war es in allen getesteten Systemen möglich, AlsR in großen Mengen zu produzieren. Allerdings konnte das Protein nicht gereinigt werden, da es nur in sehr geringen Mengen löslich in der cytoplasmatischen Fraktion vorlag. Der größte Teil des produzierten AlsR lag in Einschlusskörpern, sogenannten „inclusion bodies“, vor. Versuche, AlsR aus diesen „inclusion bodies“ zu renaturieren, waren erfolglos (Büttner, 2007).

2 ZIELSETZUNG

Um eine biochemische Charakterisierung des transkriptionellen Regulators AlsR aus *B. subtilis* zu ermöglichen, sollte das Protein rekombinant in ausreichenden Mengen produziert werden. Es gab bereits Versuche, *B. subtilis* AlsR rekombinant mit verschiedenen Expressionssystemen in *E. coli* zu produzieren. Jedoch lag das Protein stets als Aggregat in Einschlusskörpern vor. Daher bestand die Notwendigkeit, ein geeignetes Expressionssystem zu etablieren, mit dem AlsR in löslicher Form produziert werden kann. Anschließend sollte das Protein mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden

Rekombinant produziertes und gereinigtes AlsR sollte hinsichtlich seiner DNA-Bindungseigenschaften untersucht werden. Damit einhergehend sollte die DNA-Sequenz bestimmt werden, an welche AlsR im Promotor des *alsSD* Operons bindet. Der Effektor von AlsR aus *B. subtilis* sollte bestimmt werden. Hierbei sollten Acetat und andere organische Säuren, die von *B. subtilis* während der Fermentation bzw. während des „*overflow*“ Metabolismus synthetisiert werden, als eventuelle Effektoren untersucht werden. Auch ein reduzierter externer pH-Wert sollte auf potentielle effektorische Eigenschaften für AlsR getestet werden. Hierfür sollte eine Methode zur intrazellulären pH-Messung etabliert werden.

Ferner sollte das Regulon von AlsR aus *B. subtilis* bestimmt werden, um zu untersuchen, ob AlsR an der Regulation weiterer Gene und/oder Operons beteiligt ist. Dabei sollte ebenfalls überprüft werden, ob AlsR für die Expression des *ldh-lctP* Operons essentiell ist. Dies sollte durch Microarray-Analysen geschehen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Tab. 3 In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell/Bezeichnung	Referenz
Agarosegelelektrophorese	Agagel Mini, Agagel Standard, Powersupply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Agarosegeldokumentation	GelDoc, Quantity One	BioRad, München, Deutschland
Autoklav	Autoklav vom Typ FVA/A1	Fedegari, Bedano, Schweiz
Äkta-Purifier	Äkta™ Purifier	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNA-Sequenzierung	ABI PRISM® 310	Applied Biosystems, Foster City, USA
Elektroporation	Gene Pulser II, Pulse Controller Plus	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
Fluoreszenz-Laserscanner	Molecular Imager FX	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
French Press	French® Pressure Cell Press	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
HPLC	HPLC-System	Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland
HPLC-Ionenaustausch-säule	EurokatH	Knauer, Berlin, Deutschland
Hybridisierungsöfen	OV5	Biometra, Göttingen, Deutschland
Lagerung/Kühlung	Liebherr Comfort, Liebherr Premium VIP Series -86 °C	Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen, Deutschland Sanyo, München, Deutschland
Lumineszenz-Spektrometer	LS50B	PerkinElmer, Waltham, USA
Mikro-Dismembrator	Mikro-Dismembrator S	Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Microarray-Scanner	GenePix Personal 4100A	Axon Instruments, Sunnyvale, USA
Microarray-Hybridisierungskammer	DNA Microarray Hybridization Chamber - SureHyb	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Gerät	Modell/Bezeichnung	Referenz
Microarray-Hybridisierungs- sofen	DNA Microarray Hybridization Oven	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
pH-Messgerät	pH211 Mikroprozessor pH-Meter	HANNA Instruments, Woonsocket, USA
Phosphor-Screen	Kodak Storage Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Photometer	Ultrospec2100pro	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
	Nanodrop	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Pipetten	LABMATE	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore, Billerica, USA
Rollentaumelmischgerät	RM5	Ingenieurbüro CAT, Staufen, Deutschland
Röntgenfilm- Entwicklungs- maschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Scintillationszähler	Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2900TR	Packard Bioscience Company, Meriden, USA
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protean II	BioRad, München, Deutschland
Thermocycler	Tpersonal, Tgradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Ultraschallbad	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus HD2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene, Santa Clara, USA
Vakuumblot-Einheit	VacuGene XL	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Vakuumblot-Pumpe	VacuGene Pump	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Vakuum-Trocknungseinheit für Acrylamidgele	- Geltrockner PH-t 40	Biotech Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland
	- Kühlfalle KF	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
	- Vakuum-Pumpe High Vacuum Pump E1M5	Edwards High Vacuum Int., Crawley, England
Waagen	ACL-3100.2, BL1500, BL61S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Gerät	Modell/Bezeichnung	Referenz
Wasserbadschüttler	Aquatron	HT Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	RC 5B Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Kits von folgenden Firmen bezogen: Agilent Technologies (Santa Clara, USA), Finnzymes (Espoo, Finnland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Billerica, USA), New England Biolabs (Ipswich, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland), Riedel-de-Häen (München, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.3 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 4 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme. * BGSC: *Bacillus* Genetic Stock Center

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B TM	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
BL21 Codon Plus TM (DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> Δ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cat ^r]	Stratagene, Santa Clara, USA
<i>Bacillus subtilis</i>		
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	BGSC 1A96
HRB7	<i>trpC2 pheA1 amyE::-341alsS-lacZ cat</i>	(Reents <i>et al.</i> , 2006a)
IGB13	<i>trpC2 pheA1 rex::kan</i>	A. Hartmann, 2005
MH5081	<i>trpC2 pheA1 resDE::tet</i>	(Sun <i>et al.</i> , 1996)

Stamm	Genotyp	Referenz
MH5636	<i>trpC2 pheA1 rpoCΩ pYQ52 cat</i>	(Qi and Hulett, 1998)
Stamm 42	<i>trpC2 pta::spc</i>	Dr. Glaser, Institut Pas- teur, Paris, Frankreich
THB2	<i>trpC2 pheA1 fnr::spc</i>	(Hoffmann <i>et al.</i> , 1995)
WH108	<i>ccpA::kan; alsS-lacZ</i>	Prof. Dr. Hil- len, Universi- tät Erlangen, Deutschland
AMBs1	<i>trpC2 pheA1 amyE::alsR-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs2	<i>trpC2 pheA1 alsR::spc</i>	(March, 2005)
AMBs3	<i>trpC2 pheA1 alsR::spc; amyE::-341alsS-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs4	<i>trpC2 pheA1 alsR::spc; amyE::alsR-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs5	<i>trpC2 pheA1 fnr::spc; amyE::alsR-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs6	<i>trpC2 pheA1 resDE::tet; amyE::alsR-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs7	<i>trpC2 pheA1 amyE::-200alsS-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs8	<i>trpC2 pheA1 amyE::-145alsS-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs9	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86alsS-lacZ cat</i>	(March, 2005)
AMBs10	<i>trpC2 pheA1 amyE::-116alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs11	<i>trpC2 pheA1 amyE::-50alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs12	<i>trpC2 pheA1 amyE::-72alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs13	<i>trpC2 pheA1 amyE::-62alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs14	<i>trpC2 pheA1 amyE::-56alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs17	<i>trpC2 pheA1 pta::spc; amyE::-341alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs18	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86 ΔAlsR (-79/-78 TA\rightarrowGG) alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs19	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86 ΔAlsR (-76/-75 TA\rightarrowGG) alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs20	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86 ΔAlsR (-66/-65 TA\rightarrowGG) alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs21	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86 ΔAlsR (-59/-58 TA\rightarrowGG) alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs22	<i>trpC2 pheA1 amyE::-86 ΔAlsR (-76/75 TA\rightarrowGG, -66/65 TA\rightarrowGG) alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
AMBs23	<i>trpC2 pheA1 amyE::</i> -86 Δ AlsR (-76/75 TA→GG, -59/58 TA→GG) <i>alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs24	<i>trpC2 pheA1 rex::kan; amyE::alsR-lacZ cat</i>	Diese Arbeit
AMBs25	<i>trpC2 pheA1 rex::kan; amyE::</i> -341 <i>alsS-lacZ cat</i>	Diese Arbeit

Tab. 5 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Relevante Charakteristika	Referenz
pDIA5322	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> Klonierungsstelle vor promotorlosem <i>lacZ</i> Gen; Integration in den <i>amyE</i> -Locus von <i>B. subtilis</i> , Amp ^r , Cat ^r	(Cruz Ramos <i>et al.</i> , 1995)
pET32a	IPTG-induzierbarer T7-Promotor, N-terminaler His-Tag, Thioredoxin Tag, Enterokinase-Schnittstelle	Novagen, Madison, USA
pET32a-AlsR	906 bp <i>alsR</i> Gen über <i>NcoI</i> und <i>XhoI</i> in pET32a kloniert	Diese Arbeit
pET52b	IPTG-induzierbarer T7-Promotor, N-terminaler <i>Strep</i> -Tag II, HRV 3C Protease-Schnittstelle	Novagen, Madison, USA
pET52bTrx	Trx Tag aus pET32a über <i>NcoI</i> und <i>XbaI</i> in pET52b kloniert	Diese Arbeit
pET52bTrx-AlsR	906 bp <i>alsR</i> Gen über <i>XmaI</i> und <i>SacI</i> in pET52bTrx kloniert	Diese Arbeit
pHRB7	881bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	(Reents <i>et al.</i> , 2006a)
p-200 <i>alsS-lacZ</i>	740 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	(March, 2005)
p-116 <i>alsS-lacZ</i>	656 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-50 <i>alsS-lacZ</i>	590 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu1	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-79/-78 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu2	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-76/-75 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu3	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-66/-65 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu4	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-59/-58 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit

Name	Relevante Charakteristika	Referenz
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu2/mu3	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>Bam</i> HI <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-76/-75 TA→GG, -66/-65 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit
p-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu2/mu4	626 bp <i>EcoRI</i> , <i>Bam</i> HI <i>alsS</i> -Promotorfragment mit Basenaustausch (-76/-75 TA→GG, -59/-58 TA→GG) vor <i>lacZ</i> Gen in pDIA5322 kloniert, Cat ^r	Diese Arbeit

3.4 Oligonukleotide

3.4.1 Oligonukleotide für Klonierungsarbeiten

Tab. 6 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für Klonierungsarbeiten. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, Basenaustausche in Fettdruck dargestellt.

Name	Sequenz	Gebrauch
EH47	5'-CCGTGGATCCTGCCCTGCTGACGCTAT-3'	<i>alsS-lacZ</i>
EH128	5'-CCGGAATT <u>CG</u> CGAAGCTCCATTCAATA-3'	-116 <i>alsS-lacZ</i>
EH132	5'-CCGGAATT <u>CG</u> GCGAATCGATATTGGAG-3'	-50 <i>alsS-lacZ</i>
AM18	5'-CCGGAATT <u>CT</u> CGTATTACATATTAATC-3'	-72 <i>alsS-lacZ</i>
AM19	5'-CCGGAATT <u>CT</u> CATAAGGCGAATCGATA-3'	-56 <i>alsS-lacZ</i>
AM20	5'-CCGGAATT <u>CT</u> TATTAATCATAAGGCGAA-3'	-62 <i>alsS-lacZ</i>
EH211	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTGGAATAATTCGT-3'	-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu1
EH212	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTTAAGGATTCGT-3'	-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu2
AM35	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTTAATAATTCGTATGGCATATTAATC-3'	-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu3
AM36	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTTAATAATTCGTATTACATATGGATCATAAG-3'	-86 <i>alsS-lacZ</i> -mu4
AM37	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTTAAGGATTCGTATGGCATATTAATC-3'	-86 <i>alsSlacZ</i> -mu2/mu3
AM38	5'-CCGGAATT <u>CAT</u> AGGTTAAGGATTCGTATTACATATGGATCATAAG-3'	-86 <i>alsSlacZ</i> -mu2/mu4
AM21	5'-CATGGCCATGGAGCTTCGCCATCTTC-3'	Amplifikation <i>alsR</i> für pET32a
AM22	5'-CCGCTCGAGTCATGTACCTGCATCAC-3'	Amplifikation <i>alsR</i> für pET32a

Name	Sequenz	Gebrauch
EH227	5'-CATGCCATGGCAGAACCAGAACCGGCC-3'	Amplifikation <i>trx</i> für pET52bTrx
EH228	5'-CCTCTAGAAATAATTTTGTTTA-3'	Amplifikation <i>trx</i> für pET52bTrx
EH225	5'-TCCCCC <u>CGGG</u> ATGGAGCTTCGCCATCTTC-3'	Amplifikation <i>alsR</i> für pET52bTrx- AlsR
EH236	5'-GCGAGCTCTCATGTACCTGCATCACTC-3'	Amplifikation <i>alsR</i> für pET52bTrx- AlsR

3.4.2 Oligonukleotide für „Primer Extension“-Analysen

Tab. 7 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für „Primer Extension“-Analysen.

Name	Sequenz	Gebrauch
AM13	5'-GCTACTGCGATAAAGTATTGAAGATGG-3'	<i>alsR</i> „Primer Extension“

3.4.3 Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen

Tab. 8 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen. Basenaustausche sind in Fettdruck, Schnittstellen für Restriktionsenzyme unterstrichen dargestellt.

Name	Sequenz	Gebrauch
EH129	5'-CCGGAATTCATAGGTAATAATTCGT-3'	<i>alsS</i> EMSA (PCR)
EH175	5'-CCTCACTCCTTATTATGCATT-3'	<i>alsS</i> EMSA (PCR)
EH219	5'-TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATAT TAATCATAAGGC-3'	<i>alsS</i> EMSA
EH220	5'-GCCTTATGATTAATATGTAATACGAATTAT TAACCTATGGAA-3'	<i>alsS</i> EMSA
EH223	5'-TTCCATAGGTTAAGGATTCGTATTACATAT GGATCATAAGGC-3'	<i>alsS</i> -mu2/mu4 EMSA
EH224	5'-GCCTTATGATCCATATGTAATACGAATCCT TAACCTATGGAA-3'	<i>alsS</i> -mu2/mu4 EMSA

3.4.4 Oligonukleotide für *alsS* DNaseI-Protektionsanalysen

Tab. 9 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für DNaseI-Protektionsanalysen. * 5'-Dig-oxygenin-Markierung.

Name	Sequenz	Gebrauch
EH174	5'-GAGAGGAGGCTGCGTCATGTT-3'	<i>alsS</i> DNaseI-Footprint
DIG-EH174	* 5'-GAGAGGAGGCTGCGTCATGTT-3'	<i>alsS</i> DNaseI-Footprint
EH175	5'-CCTCACTCCTTATTATGCATT-3'	<i>alsS</i> DNaseI-Footprint
DIG-EH175	* 5'-CCTCACTCCTTATTATGCATT-3'	<i>alsS</i> DNaseI-Footprint

3.4.5 Oligonukleotide für *alsS in vitro* Transkriptionsanalysen

Tab. 10 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide für *alsS in vitro* Transkriptionsanalysen.

Name	Sequenz	Gebrauch
EH128	5'-CCGGAATTCGCGAAGCTCCATTCAATA-3'	<i>alsS in vitro</i> -Transkription
EH235	5'-CGCCCCTCTGTTTTTCACAAG-3'	<i>alsS in vitro</i> -Transkription

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer bei 121 °C für 20 min und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Puffer für RNA-Arbeiten wurden doppelt dampfsterilisiert. Antibiotika und andere temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters 0,2 µm).

3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf eine LB-Agar-Platte, welche bei Bedarf mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war, ausgestrichen. Die Platte wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf die LB-Agar-Platte mittels eines Drigalski-Spatels ausgestrichen und die Platte wie oben angegeben inkubiert.

LB-Agar-Platten	5,0	g/l	Hefeextrakt
	10,0	g/l	Pepton
	10,0	g/l	NaCl
	18,0	g/l	Agar-Agar in dest. H ₂ O

3.5.3 Wachstumsbedingungen für *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

3.5.3.1 Wachstumsbedingungen für *Escherichia coli*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und in Flüssigmedium überführt, welches bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt.

Für aerobe Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, 100 ml beimpftes LB-Flüssigmedium in 300 ml Schikanekolben bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Für aerobe Kulturen in kleinerem Maßstab wurden 10 ml inokuliertes Flüssigmedium in Reagenzröhrchen bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

LB-Medium	5,0	g/l	Hefeextrakt
	10,0	g/l	Pepton
	10,0	g/l	NaCl
			in dest. H ₂ O

3.5.3.2 Wachstumsbedingungen für *Bacillus subtilis*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und in Flüssigmedium überführt, welches bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt.

Für aerobe Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, 100 ml beimpftes LB-Flüssigmedium (Kap. 3.5.3.1) in 300 ml Schikanekolben bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Für aerobe Kulturen in kleinerem Maßstab wurden 10 ml inokuliertes Flüssigmedium in Reagenzröhrchen bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurde erst eine Vorkultur des entsprechenden *B. subtilis* Stammes in LB-Medium angesetzt. Nach achttündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde mit 1 ml dieser Vorkultur eine Vorkultur in SMM-Medium inokuliert. Diese wurde für 16 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für aerobe Kulturen wurden 100 ml beimpftes SMM-Flüssigmedium in 300 ml Schikanekolben bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Start-OD₅₇₈ von aeroben Kulturen betrug 0,05. Anaerobe Kulturen wurden in vollständig gefüllten 125 ml Transfusionsflaschen, die mit einem Silikonseptum und einer Schraubdichtung

verschlossen waren, bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Die Start-OD₅₇₈ von anaeroben Kulturen betrug 0,3.

SMM-Medium

SMM-Basis	2,0	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	80,0	mM	K ₂ HPO ₄
	44,0	mM	Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O
	0,8	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
			in dest. H ₂ O
10 x SMM-Mix	0,8	mM	L-Phenylalanin
	1,0	mM	L-Tryptophan
	1,5	mM	Thiaminchlorid-hydrochlorid
	50,0	mM	D(+)-Glukose-Monohydrat
	50,0	mM	Pyruvat (Natriumsalz)
			in dest. H ₂ O
100 x SMM Spurenelemente	0,6	g/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	1,3	g/l	FeCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,1	g/l	MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	0,04	g/l	CuCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,06	g/l	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	0,06	g/l	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	0,17	g/l	ZnCl ₂
			in dest. H ₂ O
Casaminoacid-Lösung	10,0	%(w/v)	Casaminoacids
			in dest. H ₂ O
Zusammensetzung des SMM-Mediums (1 l)			
	880,0	ml	SMM-Basis
	100,0	ml	10 x SMM-Mix
	10,0	ml	100 x Spurenelemente
	10,0	ml	Casaminoacids

3.5.4 Antibiotika

Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (Tab. 11). Diese Stammlösungen wurden den sterilisierten, abgekühlten Medien in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 11 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

	Stammlösung	Endkonzentration für <i>E. coli</i>	Endkonzentration für <i>B. subtilis</i>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100 % EtOH	34 µg/ml	5 µg/ml
Erythromycin	2 mg/ml in 100 % EtOH	-	2 µg/ml
Kanamycin	5 mg/ml in H ₂ O	-	5 µg/ml
Lincomycin	25 mg/ml in H ₂ O	-	25 µg/ml
Spectinomycin	60 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml	60 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml in 70 % EtOH	-	5 µg/ml

3.5.5 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.

3.5.6 Anlegen von Glyzerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wurde LB-Medium, welches bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und für 16 Stunden bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit sterilem Glyzerin (Endkonzentration 20 %) vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.5.7 Test auf Amylase-Aktivität

Die auf Amylase-Aktivität zu testenden Zellen wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, welche 1 % (w/v) Stärke enthielten, und anschließend 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Lugol'scher Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet. Bildete sich nach 10 Minuten Inkubation bei RT ein heller Hof um eine Kolonie aus, deutete dies auf Stärkeabbau und folglich auf einen intakten *amyE*-Locus hin.

LB-Agar-Platten mit Stärke	5,0	g/l	Hefeextrakt
	10,0	g/l	Pepton
	10,0	g/l	NaCl
	10,0	g/l	Stärke
	18,0	g/l	Agar-Agar
			in dest. H ₂ O

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung kompetenter *Bacillus subtilis* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *B. subtilis* Zellen wurde der betreffende Stamm auf eine LB-Agar-Platte, die bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt, ausgestrichen und bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert. Mit Zellen dieser Agar-Platte wurden 20 ml frisch angesetztes, auf 37 °C vorgewärmtes SpC-Medium inokuliert und bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Bei Erreichen der Stationärphase wurden 2 ml dieser Kultur in 200 ml frisch angesetztes, auf 37 °C vorgewärmtes SpII-Medium überführt. Nach 90minütiger Inkubation bei 160 rpm und 37 °C wurden die Zellen sedimentiert (5 min, 5.000 g, 4 °C). Das Zellsediment wurde vorsichtig in 7 ml des aufbewahrten Überstands resuspendiert und mit 1 ml sterilem Glycerin (100 %) versetzt. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

T-Base	15,0 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	80,0 mM	K ₂ HPO ₄
	44,0 mM	KH ₂ PO ₄
	3,4 mM	Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O
		in dest. H ₂ O
SpC-Medium	1,0 %(v/v)	Glukoselösung
	1,5 %(v/v)	MgSO ₄ -Lösung
	2,0 %(v/v)	Hefeextraktlösung
	2,5 %(v/v)	Casaminoacidlösung
		in T-Base
SpII-Medium	1,0 %(v/v)	Glukoselösung
	7,0 %(v/v)	MgSO ₄ -Lösung
	1,0 %(v/v)	Hefeextraktlösung
	1,0 %(v/v)	Casaminoacidlösung
	0,5 %(v/v)	CaCl ₂ -Lösung
		in T-Base
Glukoselösung	50,0 %(w/v)	D(+)-Glukose-Monohydrat
		in dest. H ₂ O
MgSO ₄ -Lösung	1,2 %(w/v)	MgSO ₄
		in dest. H ₂ O
Hefeextraktlösung	10,0 %(w/v)	Hefeextrakt
		in dest. H ₂ O

Casaminoacidlösung	1,0 %(w/v)	Casaminoacids in dest. H ₂ O
CaCl ₂ -Lösung	100,0 mM	CaCl ₂ in dest. H ₂ O

3.6.2 Transformation von *Bacillus subtilis*

Zur Transformation von *B. subtilis* mit chromosomaler DNA wurden 20 µg DNA, zur Transformation mit Plasmid-DNA 5 µg eingesetzt. Dazu wurde ein Aliquot von 250 µl kompetenten Zellen mit dem gleichen Volumen SpII + EGTA gemischt. Diese Suspension wurde zu der DNA-Lösung gegeben. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 300 rpm und 37 °C (Thermomixer Compact, Eppendorf, Deutschland). Anschließend wurden die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf der Platte sichtbar.

SpII + EGTA	200,0 ml	SpII-Medium ohne CaCl ₂
	4,0 ml	EGTA-Lösung
EGTA-Lösung	100,0 mM	EGTA pH 8,0; in dest. H ₂ O

3.6.3 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli* Zellen

Eine Übernachtskultur von 7 ml LB-Medium, die bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt, wurde mit einer Einzelkolonie beimpft. Nach 16stündiger Inkubation bei 200 rpm und 37 °C wurden 5 ml dieser Vorkultur zur Inokulation von 500 ml LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde bei 200 rpm und 37 °C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ zwischen 0,5 und 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das erhaltene Sediment wurde in 40 ml eiskaltem, sterilem Wasser vorsichtig resuspendiert und erneut sedimentiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift mit Wasser wiederholt. Das Sediment wurde in 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut sedimentiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Abschließend wurde das Sediment in 1 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und aliquotiert, und entweder direkt für eine Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Transformation von *Escherichia coli* mittels Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* Stämmen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Dazu wurden 10 - 500 ng Plasmid-DNA zu je 40 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen gegeben. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) gegeben. Die Einstellungen des GenePulserII (BioRad, München, Deutschland) waren wie folgt:

Kapazität	25,0	µF
Spannung	2,5	kV
Widerstand	200,0	Ω
Spannungsstoß	4,8 – 5,0	ms

Im Anschluss an den Impuls wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml LB-Medium bei 300 rpm und 37 °C für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation waren Einzelkolonien auf der Platte sichtbar.

3.6.5 Präparation chromosomaler *Bacillus subtilis* DNA

Zur Präparation chromosomaler *B. subtilis* DNA wurden die Zellen einer Übernachtskultur sedimentiert und in 4 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 10 mg Lysozym gegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Sarkosyllösung zur weiteren Lyse hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 37 °C wurden 4 ml Phenol zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf einem Rollentaumelmischgerät bei RT inkubiert und dann sedimentiert (15 min, 5.000 g, 4 °C). Anschließend wurde die wässrige Phase in ein 15 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Anschließend wurde die wässrige Phase in ein 50 ml Röhrchen überführt und die chromosomale DNA mit 400 µl Natriumacetatlösung und 10 ml eiskaltem Ethanol (100 %) gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder Wasser gelöst.

Lysis-Puffer	100,0	mM	NaCl
	50,0	mM	EDTA
			pH 7,5; in dest. H ₂ O

Sarkosyllösung	20,0	%(w/v)	N-Lauroylsarcosin in dest. H ₂ O
Natriumacetatlösung	3,0	M	Natriumacetat pH 4,8; in dest. H ₂ O
TE-Puffer	10,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0) in dest. H ₂ O

3.6.6 Plasmid-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Zellen aus 4 ml Kultur sedimentiert (10 min, 5.000 g, RT) und in 1 ml STE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 250 µl Lysis-PufferI resuspendiert. Dann wurden 500 µl Lysis-PufferII zugegeben, und es wurde durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 400 µl Chloroform zugegeben und vorsichtig gemischt. Danach wurden 750 µl Lysis-PufferIII zugegeben, es wurde vorsichtig gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20 min, 18.000 g, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl Isopropanol versetzt, gut vermischt und anschließend für mindestens 20 min bei -20 °C zum Fällern der DNA gelagert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min, 18.000 g, 4 °C) sedimentiert, in 250 µl TE-Puffer gelöst und mit 1 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 300 rpm und 37 °C inkubiert. Es folgten eine Phenol-Chloroform-Isomylalkohol- (25:24:1) und eine Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (24:1). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen 3,0 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt und die DNA bei -20 °C für mindestens 20 Minuten gefällt. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde sedimentiert (15 min, 18.000 g, 4 °C), zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in TE-Puffer oder Wasser gelöst.

STE-Puffer	100,0	mM	NaCl
	10,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0) in dest. H ₂ O
Lysis-PufferI	50,0	mM	D(+)-Glukose-Monohydrat
	10,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0) in dest. H ₂ O

Lysis-PufferII	200,0	mM	NaOH
	1,0	%(w/v)	SDS
			in dest. H ₂ O
Lysis-PufferIII	4,0	M	Kaliumacetat
	11,4	%	Essigsäure
			in dest. H ₂ O
Natriumacetatlösung	3,0	M	Natriumacetat
			pH 4,8; in dest. H ₂ O
TE-Puffer	10,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0)
			in dest. H ₂ O

3.6.7 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 260 nm im NanoDrop-Photometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Eine Extinktion von 1 wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml ssDNA gleichgesetzt. Die Reinheit der jeweiligen Lösung ergab sich aus dem Quotienten der Extinktionen, die bei 260 und 280 nm gemessen wurden, und unterschritt einen Wert von 1,8 nicht.

3.6.8 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus chromosomaler *B. subtilis* DNA oder aus Plasmid-DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zu 50 ng Plasmid-DNA bzw. 200 ng chromosomaler DNA als Matrize wurden 10 µl HF-Puffer (Finnzymes, Espoo, Finnland), 5 µl dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Mix (Ausgangskonzentration: je 2,5 mM) und jeweils 10 pmol der Primer gegeben. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit sterilem, deionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde 0,25 U Phusion-Polymerase™ (Finnzymes, Espoo, Finnland) zugegeben und die PCR gestartet. Nach einer initialen Denaturierung der DNA wurden 30 PCR-Zyklen durchlaufen. Ein Zyklus bestand aus der Denaturierung der DNA, der Anlagerung der Primer und der Amplifikation der DNA. Die Reaktion wurde durch einen finalen Amplifikationsschritt beendet. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer hing von deren Länge und G+C-Gehalt ab. Weiterhin wurde sie

durch eventuell eingebaute Fehlbasenpaarungen beeinflusst. Die Schmelztemperatur der Primer wurde wie folgt berechnet.

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41(\%G+C) - 650/n$$

%G+C : G+C-Gehalt des Primers

n : Nukleotid-Anzahl des Primers

Die Dauer des Schritts zur DNA-Synthese war abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und betrug 30 Sekunden pro 1 kb. Das Standardprotokoll der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

98 °C	3 min	Initiale Denaturierung der DNA	} 30 Zyklen
98 °C	1 min	Denaturierung der dsDNA	
45 – 65 °C	1 min	Anlagerung der Primer	
72 °C	0,5 min/kb	DNA-Amplifikation	
72 °C	8 min	Finale DNA-Amplifikation	

3.6.9 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Ipswich, USA) nach Vorschrift des Herstellers.

3.6.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

Für sämtliche Klonierungsarbeiten wurden DNA-Fragmente nach erfolgter Restriktion aus ein- bis zweiprozentigen Agarosegelen mit Hilfe eines Geextraktions-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und gereinigt. Zur Reinigung per PCR amplifizierter DNA wurde ein PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Bei beiden Kits wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die Elution der DNA erfolgte in 33 µl H₂O.

3.6.11 Ligation von DNA

Während der letzten Stunde der Restriktion von Plasmid-DNA wurden 5 U Antarktische Alkalische Phosphatase (AAP, New England Biolabs, Ipswich, USA) zum Restriktionsansatz gegeben, um das Plasmid zu dephosphorylieren. Anschließend wurden sowohl die AAP als auch die Restriktionsenzyme durch 15minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und die gespaltene DNA gereinigt (Kap. 3.6.10).

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dazu wurden 25 ng Vektor, 100 ng Insert, 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA), 2 µl 10fach Ligationspuffer (New England Biolabs, Ipswich, USA) und ein entsprechendes Volumen destilliertes Wasser für 16 Stunden bei 17 °C inkubiert. Die T4-DNA-Ligase wurde anschließend durch 15minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

3.6.12 DNA-Gelelektrophorese

Für die Separation von DNA-Fragmenten wurden je nach erwarteter Fragmentgröße ein- bis zweiprozentige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit Lade-
puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Gene-
Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Burlington, Canada) oder der Mass-Ruler™
DNA Ladder Mix (Fermentas, Burlington, Canada). Bei ihrer Verwendung wurde
nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die Trennung der DNA-Fragmente
erfolgte abhängig von der Größe des Agarosegels mit einer Spannung von
90 - 120 V. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele mit dem Fluoreszenz-
farbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Dadurch konnten DNA-haltige Gelbereiche durch
Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ visualisiert und über eine
Geldokumentationsanlage digitalisiert werden.

TAE-Puffer	40,0 mM	Trisacetat (pH 8,0)
	1,0 mM	EDTA (pH 8,0)
		in deion. H ₂ O
Agarose-Gel	1,0 – 2,0 %(w/v)	Agarose in TAE-Puffer
Ethidiumbromidlösung	0,1 %(w/v)	Ethidiumbromid in deion. H ₂ O
Probenpuffer (10x)	350,0 µM	Bromphenolblau
	450,0 µM	Xylen Cyanol FF
	0,25 %(w/v)	Orange G
	115,0 µM	Saccharose
		in dest. H ₂ O

3.6.13 DNA-Sequenzbestimmung

Um den Erfolg einer Klonierung sicherzustellen, wurde die DNA-Sequenz be-
stimmt. Dies erfolgte durch Sequenzierung mit Hilfe eines Kapillarsequenzierers

(Applied Biosystems, Foster City, USA). Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Der DNA-Sequenzvergleich erfolgte durch das Programm *MegaAlign* (DNASar, Konstanz, Deutschland).

3.6.14 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von *Bacillus subtilis* AlsR

Zur biochemischen Charakterisierung von AlsR wurde das *alsR* Gen aus *B. subtilis* in verschiedene Expressionsplasmide kloniert. Das Plasmid pET32a wurde verwendet, da es das Gen für einen N-terminalen Thioredoxin-Tag (Trx-Tag) enthält. Fusionen von zu produzierenden Proteinen mit einem Trx-Tag führen oft zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins. Das *alsR* Gen aus *B. subtilis* wurde mit den Oligonukleotiden AM21 und AM22 aus genomischer DNA des Stamms JH642 amplifiziert und über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* mit dem Plasmid pET32a (Novagen, Madison, USA) zu pET32a-AlsR fusioniert. Weiterhin wurde das *alsR* Gen aus *B. subtilis* in das Expressionsplasmid pET52bTrx kloniert. Hierfür wurde zunächst das Plasmid pET52bTrx als eine modifizierte Version des bereits bestehenden Plasmids pET52b (Novagen, Madison, USA) konstruiert, um die Löslichkeit von Fusions-Proteinen zu erhöhen. Dazu wurde das Gen für den N-terminalen Trx-Tag in das Plasmid pET52b kloniert. Das *trx* Gen wurde per PCR mittels der Oligonukleotide EH227 und EH228 aus dem Plasmid pET32a amplifiziert und über die Schnittstellen *NcoI* und *XbaI* mit dem Plasmid pET52b zu pET52bTrx fusioniert. Das *alsR* Gen wurde aus genomischer DNA des Stamms JH642 per PCR mit den Primern EH225 und EH236 amplifiziert und über die Schnittstellen *XmaI* und *SacI* mit dem Plasmid pET52bTrx zu pET52bTrx-AlsR fusioniert. Zur Proteinproduktion wurde der *E. coli* Stamm BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL (Stratagene, Santa Clara, USA, Tab. 4) mit diesen Plasmiden transformiert.

3.6.15 Herstellung von *Bacillus subtilis* Stämmen zum Test von Reporterfusionen

Zur Herstellung der *B. subtilis* Stämme AMBs24 und AMBs25 wurde der Stamm IGB13 (*Δrex*) mit den integrativen Plasmiden *palsR-lacZ* bzw. pHRB7 transformiert. Zur Herstellung des Stamms AMBs17 (*Δpta*) wurde der Stamm HRB7 mit genomischer DNA des Stamms 42 transformiert.

Unterschiedlich lange Fusionen der *alsS* Promotorregion mit dem *lacZ* Gen wurden per PCR konstruiert. Dazu wurde jeweils ein Oligonukleotid, der an eine bestimmte Stelle im *alsS* Promotor bindet, mit einem zweiten Oligonukleotid kombiniert, welcher stets an der gleichen Stelle in der kodierenden *alsS* Sequenz bindet. Dadurch entstanden *alsS-lacZ* Fusionen mit unterschiedlich langer *alsS* Promotorsequenz, allerdings mit stets konstantem 3'-Ende der kodierenden Sequenz des *alsS* Gens. Als Matrize wurde chromosomale JH642 DNA verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide für die *alsS* Promotorfragmente waren EH128, EH132, AM18, AM20 und AM19, jeweils in Kombination mit dem Oligonukleotid EH47. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tab. 6 aufgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden jeweils über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* mit dem Plasmid pDIA5322 fusioniert, woraus die integrativen Plasmide p-116*alsS-lacZ*, p-50*alsS-lacZ*, p-72*alsS-lacZ*, p-62*alsS-lacZ* und p-56*alsS-lacZ* resultierten. Die Transformation von JH642 mit diesen Plasmiden resultierte in den Stämmen AMBs10, AMBs11, AMBs12, AMBs13 und AMBs14.

Alle Transformanten wurden auf Amylaseaktivität getestet, um eine stabile Integration der Promotor-*lacZ* Fusion sicherzustellen.

3.6.16 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Herstellung von *alsS-lacZ* Reportergenfusionen, die Punktmutationen an bestimmten Stellen im *alsS* Promotor aufwiesen, wurden ortsgerichtete Mutagenesen durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese waren EH211, EH212, AM35, AM36, AM37 und AM38, jeweils in Kombination mit dem Oligonukleotid EH47. Die Sequenzen der Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese sind in Tab. 6 aufgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden jeweils über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* mit dem Plasmid pDIA5322 fusioniert, woraus die Plasmide p-86*alsS-lacZ*-mu1, p-86*alsS-lacZ*-mu2, p-86*alsS-lacZ*-mu3, p-86*alsS-lacZ*-mu4, p-86*alsS-lacZ*-mu2/mu3 und p-86*alsS-lacZ*-mu2/mu4 resultierten. Die Transformation von JH642 mit diesen Plasmiden resultierte in den Stämmen AMBs18, AMBs19, AMBs20, AMBs21, AMBs22 und AMBs23 (Tab. 4).

Alle Transformanten wurden auf Amylaseaktivität getestet, um eine stabile Integration der Promotor-*lacZ* Fusion sicherzustellen.

3.6.17 Präparation von *Bacillus subtilis* Gesamtzell-RNA

Es wurde zunächst jeweils eine Vorkultur des gewünschten Stamms in LB-Medium angesetzt und diese sieben Stunden bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 100 ml SMM-Medium inokuliert und 16 Stunden bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden folgende Ansätze in Transfusionsflaschen mit Septen und Schraubverschluss beimpft:

1. ohne Zusatz:
125 ml SMM-Medium wurden mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft.
2. mit Acetat:
125 ml SMM-Medium wurden mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft. Zuvor wurde dem Medium Kaliumacetat in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben.
3. pH 6,0:
125 ml SMM-Medium wurden mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft. Zuvor wurde der pH-Wert des Mediums mit 2 N HCl auf 6,0 abgesenkt.

Die Bakterienkulturen wurden bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm kontrolliert und die Zellen in der logarithmischen Phase geerntet. Dazu wurden jeweils 25 ml Bakterienkultur mit 25 ml angetautem Killing-Puffer gemischt und sedimentiert (5 min, 5.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in flüssigem Stickstoff eingeforen und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Zellen wurden aufgetaut, in dem im Gefäß verbliebenen Überstand resuspendiert und in einem Mikro-Dismembrator für 2 min bei 2.600 rpm aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in 1 ml auf 60 °C temperierten Lysis-Puffer aufgenommen, und anschließend mit 1 ml saurem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und dann mit 1 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 1 Volumen Isopropanol für mindestens eine Stunde bei -80 °C gefällt. Nach erfolgter Sedimentation der RNA (10 min, 18.000 g, 4 °C) wurde diese getrocknet und anschließend in 180 µl RNA-Storage-Puffer resuspendiert. Es folgten die Zugabe von 20 µl 10 x DNase-Puffer und 30 U DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, USA) sowie eine 30minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde die RNA über das RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch per Nanodrop bestimmt (Kap. 3.6.7). Die Qualität der

RNA wurde entweder mittels einer RNA-Gelelektrophorese oder eines Bioanalyzers überprüft.

Killing-Puffer	20,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	mM	NaN ₃
			in dest. H ₂ O
Lysis-Puffer	1,0	M	Guanidinthiocyanat
	0,8	%(v/v)	Natriumacetatlösung
	0,5	%(v/v)	N-Lauroylsarcosinlösung
			in dest. H ₂ O
N-Lauroylsarcosinlösung	10,0	%(w/v)	N-Lauroylsarcosinat
			in dest. H ₂ O
Natriumacetatlösung	3,0	M	Natriumacetat
			pH 5,2; in dest. H ₂ O
RNA-Storage-Puffer	20,0	mM	Na ₃ PO ₄ (pH 6,5)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0)
			in dest. H ₂ O
10 x DNase-Puffer	200,0	mM	Natriumacetat (pH 4,5)
	100,0	mM	MgCl ₂
	100,0	mM	NaCl
			in dest. H ₂ O

3.6.18 RNA-Gelelektrophorese

1,5 g Agarose wurden in 127,8 ml doppelt autoklaviertem Wasser durch Erwärmen gelöst. Anschließend wurden 15 ml 10 x MOPS-Puffer und 7,25 ml Formaldehyd zugegeben. Die Lösung wurde in eine vorbereitete Kammer gegossen und zum Erstarren abgekühlt. 10 µl der RNA-Proben mit einer Konzentration von 1 µg/µl und ein Digoxigenin-markierter RNA-Marker (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) wurden mit 10 µl RNA-Probenpuffer bei 65 °C für 15 Minuten denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte für 4 Stunden bei 4 °C und 90 V. Nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnten RNA-haltige Gelbereiche durch Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm visualisiert und über eine Geldokumentationsanlage digitalisiert werden.

10 x MOPS-Puffer	200,0	mM	MOPS
	20,0	mM	Natriumacetat
	10,0	mM	EDTA
			pH 7,0; in dest. H ₂ O
RNA-Probenpuffer	6,5	ml	Formamid
	1,2	ml	Formaldehyd
	2,0	ml	10 x MOPS-Puffer
	0,4	ml	Saccharoselösung
	20,0	mg	Bromphenolblau
	20,0	mg	Xylencyanol
Saccharoselösung	50,0	%(w/v)	Saccharose in dest. H ₂ O
Laufpuffer (1 x MOPS-Puffer)	20,0	mM	MOPS
	2,0	mM	Natriumacetat
	1,0	mM	EDTA
			in dest. H ₂ O

3.6.19 „Primer Extension“-Analyse zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *alsR* Gens aus *Bacillus subtilis*

Für die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *alsR* Gens aus *B. subtilis* wurden 50 µg Gesamtzell-RNA einer unter fermentativen Bedingungen bis zur exponentiellen Phase gewachsenen Kultur des *B. subtilis* Stammes JH642 verwendet. Die reverse Transkription wurde ausgehend vom *alsR*-spezifischen, γ -³²P-markierten Primer AM13 (Tab. 7) initiiert. Für die radioaktive Markierung wurden 10 pmol des Primers mit 5 µl γ -³²P ATP [\geq 3000 mCi/mmol; 10 mCi/ml] (Hartmann Analytics, Braunschweig, Deutschland), 3 µl 10 x Polynukleotidkinase-Puffer (New England Biolabs, Ipswich, USA) und 20 U Polynukleotidkinase (New England Biolabs, Ipswich, USA) versetzt und mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die Polynukleotidkinase anschließend 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Reinigung des Primers erfolgte mit dem Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die spezifische Aktivität des markierten Primers wurde in einem Scintillationszähler bestimmt und unterschritt einen Wert von $1,6 \times 10^5$ cpm/µl nicht. Zur Hybridisierung des Primers an die Gesamtzell-RNA wurden 50 µg Gesamtzell-RNA mit 40 U RNasin, 1,5 µl 10 x Hybridisierungspuffer und 0,1 pmol des markierten Primers vermischt und mit dest. H₂O auf 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, 10 min bei 80 °C und anschließend 30 min bei 42 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch

Zugabe von 0,9 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,9 µl 500 mM MgCl₂, 1,0 µl 250 mM DTT, 6,75 µl Actinomycin D [1 mg/ml], 1,33 µl 5mM dNTP-Mix und 5 U AMV Reverse Transkriptase (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und 19,0 µl dest. H₂O ge-startet und eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden zum Abstoppen der Reaktion 105 µl RNase-Reaktionsmix hinzugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Iso-amylalkohol (25:24:1) und anschließend Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, wobei die wässrige Phase jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend wurde die cDNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natrium-acetat und 1 Volumen 100 % Ethanol für mindestens eine Stunde bei -20 °C gefällt. Durch Zentrifugieren wurde die cDNA sedimentiert (10 min, 18.000 g, 4 °C) und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde getrocknet und in 3 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA) resuspendiert.

Zur genauen Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *alsR* wurde parallel zur reversen Transkription eine Sequenzierungsreaktion mit demselben Primer durchgeführt, der auch für die reverse Transkription benutzt wurde. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Ohio, USA) nach Vorschrift des Herstellers. Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurde jeder der Ansätze mit 4 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA) versetzt. Die „Primer Extension“-Analyse und die Sequenzierungsreaktionen wurden für 2 min bei 85 °C denaturiert und in einem Acrylamid-Harnstoffgel bei 2.500 V für die Dauer von einer Stunde in 1 x TBE-Puffer separiert. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 3 µl. Anschließend wurde das Gel für eine Woche auf einen Röntgenfilm (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) aufgelegt und bei -80 °C gelagert. Dieser wurde entwickelt und zur Digitalisierung eingescannt.

10 x Hybridisierungspuffer	1,5	M	KCl
	100,0	mM	Tris-HCl
	10,0	mM	EDTA
	pH 8,3; in dest. H ₂ O		
RNase-Reaktionsmix	100,0	µg/ml	Lachs-Sperma-DNA
	20,0	µg/ml	RNaseA
	100,0	mM	NaCl
	100,0	mM	Tris-HCl
	10,0	mM	EDTA
	pH 8,0; in dest. H ₂ O		

Natriumacetatlösung	3,0	M	Natriumacetat pH 4,8; in dest. H ₂ O
Acrylamid-Harnstoffgel	7,0	M	Harnstoff
	6,0	%(v/v)	Acrylamid
	10,0	%(v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08	%(v/v)	APS-Lösung
	0,004	%(v/v)	TEMED
			in dest. H ₂ O
APS-Lösung	10,0	%(w/v)	Ammoniumperoxodisulfat in dest. H ₂ O
10 x TBE-Puffer	90,0	mM	Tris-HCl
	90,0	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
			in dest. H ₂ O

3.6.20 Bestimmung der Qualität von *Bacillus subtilis* Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen mittels Bioanalyzer

Die Qualität der präparierten Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen wurde mittels eines Bioanalyzers in Kombination mit einem RNA Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Für Microarray-Analysen wurde stets Gesamtzell-RNA verwendet, die eine vom Bioanalyzer ermittelte RIN (RNA-Integritäts-Nummer, „RNA-Integrity-Number“) von 8,5 nicht unterschritt.

3.6.21 Microarray-Analysen

Microarray-Analysen wurden genutzt, um das AlsR-Regulon von *B. subtilis* zu bestimmen. Weiterhin wurde untersucht, in wieweit sich die Transkriptomprofile von *B. subtilis* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (fermentativ mit Zugabe von 40 mM Acetat und fermentativ mit einem externen pH-Wert von 6,0) unterscheiden. Die „Custom-made“ Microarray-Chips wurden von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) bezogen. Das Design der DNA-Microarrays erfolgte nach Angaben der Arbeitsgruppe Mäder aus Greifswald.

3.6.21.1 Wachstumsbedingungen zur Präparation von *Bacillus subtilis* Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen

Von den *B. subtilis* Stämmen JH642 (Tab. 4) und AMBs2 (Tab. 4) wurde zunächst jeweils eine Vorkultur in LB-Medium beimpft und sieben Stunden bei 200 rpm und

37 °C inkubiert. Mit jeweils 1 ml dieser Kulturen wurden entsprechende Vorkulturen in 100 ml SMM-Medium inokuliert und 16 Stunden bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Mit diesen Übernachtskulturen wurden jeweils folgende Ansätze in Transfusionsflaschen mit Septen und Schraubverschluss beimpft:

1. mit Acetat:

125 ml SMM-Medium wurden mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft. Zuvor wurde dem Medium Kaliumacetat in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben.

2. pH 6,0:

125 ml SMM-Medium wurden mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft. Zuvor wurde der pH-Wert des Mediums mit 2 N HCl auf 6,0 abgesenkt.

Die Bakterienkulturen wurden bei 100 rpm und 37 °C bis zum Erreichen der mid-logarithmischen Phase inkubiert und anschließend geerntet. Die Kultivierungen und anschließenden RNA-Präparationen erfolgten jeweils als Vierfach-Replikate. Ernte, Präparation und Reinigung der RNA erfolgten wie in Kap. 3.6.17 beschrieben. Die Quantität der RNA wurde per Nanodrop (Kap. 3.6.7) und die Qualität der RNA mittels Bioanalyzer (Kap. 3.6.20) bestimmt.

3.6.21.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA aus *Bacillus subtilis* Gesamtzell-RNA

Für die Synthese von fluoreszenzmarkierter cDNA wurden jeweils 10 µg *B. subtilis* Gesamtzell-RNA verwendet. Mit dest. H₂O wurde das Volumen auf 20,5 µl aufgefüllt. Es folgten die Zugabe von 1,25 µg Random-Primer (Promega, Madison, USA) und 1,0 µl Spike-Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Bei RNA-Proben, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert werden sollten, wurde Spike-Mix A (1:5 in Dilutionbuffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verdünnt) verwendet. Bei RNA-Proben, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert werden sollten, wurde Spike-Mix B (1:5 in Dilutionbuffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verdünnt) verwendet. Die Ansätze wurden 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 x First Strand Buffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), 50,0 nmol DTT, dNTPs (5,0 nmol dATP, dTTP, dGTP und 1,25 nmol dCTP von Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), 1,25 nmol Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP (GE Healthcare Europa, München, Deutschland) und 400 U Superscript®II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) hinzugefügt und das Volumen wurde mit dest. H₂O auf 50,0 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden 60 min bei 42 °C inkubiert, 10 min bei 70 °C dena-

turiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 2 U RNaseH (Invitrogen, Carlsbad, USA) und Inkubation für 30 min bei RT degradiert.

3.6.21.3 Reinigung fluoreszenzmarkierter cDNA

Die fluoreszenzmarkierte cDNA wurde mit Hilfe des CyScribe GFX Purification Kits (GE Healthcare Europa, München, Deutschland) gereinigt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

3.6.21.4 Bestimmung der cDNA-Konzentration und Fluoreszenzmarkierungseffizienz

Die cDNA-Konzentration und die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung wurden per Nanodrop bestimmt. Dazu wurde am Gerät die Einstellung „Microarray“ verwendet. So wurden parallel die cDNA-Konzentration in ng/μl sowie die Einbaurate der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 bzw. Cy5 in pmol/μl gemessen. Es erfolgte dann eine Umrechnung der Einbaurate der Fluoreszenzfarbstoffe in pmol/μg cDNA. Dabei wurde ein Wert von 12,0 pmol Fluoreszenzfarbstoff pro μg cDNA nicht unterschritten.

3.6.21.5 Hybridisierung von Microarrays

Da bekannt ist, dass eine Fluoreszenzmarkierung von cDNA mit Cy3 effizienter ist als mit Cy5, erfolgte die Hybridisierung der Microarrays im sogenannten „Dye-Swap“-Verfahren. Dabei wurde jeder Array mit der cDNA des *B. subtilis* Stamms JH642 (WT cDNA) und der cDNA des Stamms AMBs2 ($\Delta alsR$ cDNA) hybridisiert. Hierbei war die WT cDNA für zwei Ansätze mit Cy3 und die $\Delta alsR$ cDNA entsprechend mit Cy5 fluoreszenzmarkiert. Für die beiden restlichen Ansätze wurde andersherum verfahren. Ein Chip enthielt jeweils vier Microarrays. Für die Hybridisierung wurden jeweils 400 ng der unterschiedlich markierten cDNAs vereinigt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 11 μl 10 x Blocking Agent (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) hinzugefügt und die Ansätze wurden für 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 55 μl 2 x GEx-Hybridization Buffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und das Volumen wurde mit dest. H₂O auf 110 μl aufgefüllt. Die Ansätze wurden gründlich vermischt und je 100 μl der Ansätze wurden zur Hybridisierung jeweils in die entsprechenden Dichtungsringe des Deckglasträgers (G2534-60011; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gegeben. Der Microarray-Slide (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurde aufgelegt und mittels einer Hybridisierungskammer (Agilent Techno-

logies, Santa Clara, USA) Chip und Deckglasträger fixiert. Die Inkubation erfolgte für 17 Stunden bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen bei 9 rpm. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Microarray-Slides von den Deckglasträgern getrennt. Dazu wurden die aneinanderhaftenden Teile unter Waschpuffer 1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einer Pinzette auseinandergezogen. Anschließend wurde der Microarray-Chip 1 min in Waschpuffer 1 und 1 min in auf 37 °C temperiertem Waschpuffer 2 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gewaschen und 30 sec in Acetonitril getrocknet. Die anschließende Aufbewahrung bis zum Scan erfolgte unter Lichtausschluss.

3.6.21.6 Scan von Microarrays

Die Microarrays wurden mit einem Axon GenePix Personal 4100A Scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gescannt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen.

3.6.21.7 Auswertung von Microarray-Daten

Die Microarrays wurden mit Hilfe des Programms „R“ durch Nutzung von „Bioconductor“ prozessiert (www.bioconductor.de; Gentleman *et al.*, 2004)). Die Prä-Prozessierung basierte auf dem „marray“-Package durch Nutzung der „read.GenePix“-Funktion. Aufgrund der Nutzung von Agilent Microarray-Chips wurde ein Kontroll-Code adaptiert und die Microarrays zur Qualitäts-Kontrolle auf Artefakte und große Unterschiede innerhalb der Replikate untersucht. Die 2-Kanal-Normalisierung wurde durch eine „Loess“-Normalisierung vorgenommen (Yang *et al.*, 2005). Differentiell exprimierte Gene wurden durch das „limma“-Package unter Nutzung von „lmFit“ für lineares Modelling, „eBayes“ für Signifikanz-Kalkulationen und „topTable“ für die Extraktion der differentiell exprimierten Gene erhalten. Die „Top Table“ wurde mit allen Sonden erstellt, deren $\ln FC \geq 1,0$ betrug. Die Zusammenfassung aller Sonden wurde durch Kalkulation der Median-Werte aller Proben erhalten.

3.6.22 Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von *Bacillus subtilis* Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) von *B. subtilis* Kulturen erfolgte mit Hilfe des grün fluoreszierenden Fluoreszenz-Farbstoffs 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (BCECF). Dessen nicht-fluoreszieren-

der Acetoxymethyl-Ester 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethyl-Ester (BCECF-AM) wird als ungeladenes Molekül durch die Zellmembran in die Zelle transportiert. In der Zelle wird BCECF-AM von unspezifischen zelleigenen Esterasen gespalten, so dass ein geladenes Molekül, das fluoreszierende BCECF, entsteht. Bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm liegt das pH-abhängige Fluoreszenzmaximum von BCECF bei 505 nm. Bei 439 nm befindet sich der pH-unabhängige isobestische Punkt von BCECF. Je höher der pH-Wert, desto höher ist auch die Fluoreszenzintensität bei 505 nm. BCECF selbst ist aufgrund seiner Ladung kaum membranpermeabel, d.h. es verbleibt in der lebenden Zelle. Das Hintergrundsignal bei pH_i-Messungen bleibt auf diese Art gering.

3.6.22.1 Zellwachstum zur Bestimmung des pH_i von *Bacillus subtilis* Kulturen

Zur Bestimmung des pH_i von *B. subtilis* Kulturen wurde erst eine Vorkultur des *B. subtilis* Stamms JH642 (Tab. 4) in LB-Medium angesetzt. Nach achtstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde mit 1 ml dieser Kultur eine Übernachtskultur in SMM-Medium angesetzt. Diese wurde für 16 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden folgende Ansätze in Transfusionsflaschen mit Septen und Schraubverschluss beimpft:

1. ohne Zusatz:

1 l SMM-Medium wurde mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft.

2. mit Nitrat:

1 l SMM-Medium, das 10 mM Natriumnitrat enthielt, wurde mit einer OD₅₇₈ von 0,3 beimpft.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 100 rpm. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,7 (frühe stationäre Wachstumsphase) wurden die Zellen durch Sedimentation (10 min, 6.000 g, 4 °C) geerntet.

3.6.22.2 Beladen von *Bacillus subtilis* Zellen mit BCECF-AM

Die sedimentierten Zellen wurden in je 50 ml TES-Puffer (pH 7,0) resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wurde jeweils 1 ml abgenommen. Weiterhin wurden je 2 ml abgenommen und als Negativkontrolle auf Eis gelagert, die nicht mit BCECF-AM beladen wurde. Bei den folgenden Inkubationsschritten wurde diese ebenso behandelt wie die Proben.

Die übrigen Zellen wurden erneut sedimentiert (10 min, 6.000 x g, 4 °C) und in jeweils 8 ml TES-Puffer (pH 7,0) resuspendiert. Anschließend wurde BCECF-AM-

Lösung (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einer Endkonzentration von 2,0 μM hinzugefügt. Zur Aufnahme des BCECF-AM in die Zellen wurden die Ansätze unter Lichtausschluss 2,5 h bei 4 °C auf einem Rollentaumelmischgerät inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 6.000 g, 4 °C) und in 80 ml TES-Puffer (pH 7,0) resuspendiert. Die 80 ml wurden zu je 10 ml auf 15 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, und die Zellen erneut sedimentiert (10 min, 6.000 g, 4 °C). Anschließend wurde jeweils eines der erhaltenen Zellsedimente in 5 ml TES-Puffer (pH 7,0) resuspendiert, unter Lichtausschluss 30 min bei 37 °C auf einem Rollentaumelmischgerät inkubiert und bis zur Fluoreszenzmessung unter Lichtausschluss auf Eis aufbewahrt. Von diesen Zellsuspensionen wurde der pH_i bestimmt. Die jeweils übrigen sieben Zellsedimente wurden zur Erstellung einer pH_i -Eichkurve verwendet.

TES-Puffer (pH 7,0)	100,0	mM	TES-NaOH (pH 7,0)
	100,0	mM	NaCl
	100,0	mM	KCl
	0,1	%(w/v)	D(+)-Glukose-Monohydrat
			in dest. H_2O

3.6.22.3 Erstellung einer pH_i -Eichkurve

Um den pH_i von Zellen bestimmen zu können, wird eine Eichkurve benötigt, die anzeigt, bei welchem pH-Wert der Fluoreszenzfarbstoff BCECF mit einer bestimmten Intensität fluoresziert. Dazu ist es notwendig, die Fluoreszenz verschiedener definierter pH_i zu bestimmen. Um einen definierten pH_i zu erzeugen, müssen die Zellen mit einem Ionophor behandelt werden, das den pH_i dem äußeren pH-Wert (pH_{ex}) gleichstellt. Hierfür wurde das lineare kanalbildende Ionophor Gramicidin D (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Gramicidin D ist ein natürliches Gemisch aus den Gramicidin-Formen A, B und C und besitzt die Primärsequenz Formyl-L-Val-D-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Xxx-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-Ethanolamin. Die 11. Aminosäure ist bei Gramicidin A ein Tryptophan (Trp), bei Gramicidin B ein Phenylalanin (Phe) und bei Gramicidin C ein Tyrosin (Tyr). Das natürliche Gemisch Gramicidin D besteht zu 80 % aus Gramicidin A, zu 6 % aus Gramicidin B und zu 14 % aus Gramicidin C. Die alternierende sterische Konformation der einzelnen Aminosäuren bewirkt in Zellmembranen die Bildung einer β -Helix. Durch die Formylgruppe am N-Terminus und die Ethanolamin-Gruppe am C-Terminus besitzt das Molekül keine geladenen Seiten (Myers and Haydon, 1972). Als lipophiles Molekül lagert sich Gramicidin in die Zellmembran

ein. Dabei bilden zwei Moleküle Gramicidin, die sich jeweils an ihrem N-Terminus zusammenlagern („Kopf-an-Kopf-Anordnung“) einen Ionenkanal in der Zellmembran, welcher für monovalente Kationen durchlässig ist. Gramicidin-Kanäle sind in der Reihenfolge $H^+ > Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$ durchlässig für monovalente Kationen (Myers and Haydon, 1972). Durch den Ausgleich der H^+ -Konzentration ist bereits nach kurzer Zeit inner- und außerhalb der Zelle der gleiche pH-Wert vorhanden.

Die erhaltenen Zellsedimente wurden nun zur Erstellung einer pH_i -Eichkurve in Puffern mit verschiedenen pH-Werten (von 5 bis 10) resuspendiert. Je ein Zellsediment wurde dafür entweder in 5 ml TES-Puffer mit einem pH-Wert von 5, 6 oder 7 oder in 5 ml Glyzin-Puffer mit einem pH-Wert von 8, 9 oder 10 resuspendiert. Dazu wurde jeweils Gramicidin D in einer Endkonzentration von 20 μM gegeben. Die Zellen wurden unter Lichtausschluss 30 min bei 37 °C auf einem Rollentaumelmischgerät inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert aller Proben mittels pH-Indikator-Stäbchen, die einen pH-Bereich von 4 bis 10 abdeckten (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), kontrolliert.

TES-Puffer (pH 4-7)	100,0	mM	TES-NaOH (pH 4-7)
	100,0	mM	NaCl
	100,0	mM	KCl
	0,1	%(w/v)	D(+)-Glukose-Monohydrat
			in dest. H_2O
Glyzin-Puffer (pH 8-10)	100,0	mM	Glyzin-NaOH (pH 8-10)
	100,0	mM	NaCl
	100,0	mM	KCl
	0,1	%(w/v)	D(+)-Glukose-Monohydrat
			in dest. H_2O
Gramicidin D Stocklösung	2,0	mM	Gramicidin D in 100 % Ethanol

3.6.22.4 Messung der Fluoreszenzintensität

Die Messung der Fluoreszenz der mit BCECF beladenen *B. subtilis* Zellen erfolgte im Fluorimeter. Das Anregungsspektrum von BCECF erstreckt sich über den Bereich von 430 bis 520 nm, die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Die Scangeschwindigkeit betrug 260 nm pro min. Ab einer Fluoreszenzintensität von 800 Einheiten wurden die Proben in ihrem entsprechenden Puffer 1:10 verdünnt gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde durch Messung des Überstands jeder Probe be-

stimmt. Dazu wurden die Zellen von je 1 ml Probe sedimentiert (5 min, 6.000 x g, 4 °C) und der Überstand im Fluorimeter vermessen. Die Negativkontrollen wurden zur Bestimmung einer möglichen Eigenfluoreszenz der Zellen ebenfalls bei den gewählten Parametern vermessen. Zur Erstellung einer Regression wurde der Quotient der pH-abhängigen Fluoreszenzintensität bei 505 nm und der pH-unabhängigen Fluoreszenzintensität bei 439 nm bestimmt und gegen den pH_{ex} aufgetragen. Im Anschluss an die Messung wurde die Lebendzellzahl aller Proben bestimmt.

3.6.22.5 Bestimmung der Lebendzellzahl von *Bacillus subtilis* Kulturen

Die Lebendzellzahl wurde vor Beginn und nach Ende des Experiments bestimmt, um sicherzustellen, dass die Zellen während des Experiments vital blieben. Dazu wurden Verdünnungen der Zellsuspensionen vor Beginn und nach Ende des Experiments (d.h. vor dem Beladen der Zellen mit BCECF-AM sowie nach der Messung der Fluoreszenzintensität) von 10⁰ bis 10⁻⁹ erstellt und jeweils auf LB-Medium ausplattiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden gezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe so die Anzahl lebender Zellen pro ml bestimmt.

3.6.23 Gelretardationsanalysen (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem AlsR aus *Bacillus subtilis*

Um zu untersuchen, ob AlsR die Fähigkeit besitzt, an die DNA-Sequenz des *alsSD* Promotors binden zu können, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt. Diese basieren darauf, dass sich ein Protein-DNA-Komplex aufgrund seiner Größe im Acrylamidgel während einer Elektrophorese langsamer bewegt, als nicht von einem Protein gebundene DNA. Dies resultiert in einer retardierten Bande.

3.6.23.1 EMSA mit per PCR amplifizierter DNA

Per PCR-Amplifikation mittels der Primer EH129 und EH175 (Tab. 8) mit dem Plasmid p-200*alsS-lacZ* (Tab. 4) als Templat wurde ein 141 bp langes DNA-Fragment hergestellt, dass der *alsSD* Promotorregion von Position -86 bis +54 entsprach. Nach Reinigung dieses Fragments mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) (Kap. 3.6.10) wurde es mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) gespalten (Kap. 3.6.9), auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.6.12), ausgeschnitten und über ein Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden, Deutschland) (Kap. 3.6.10) gereinigt. Anschließend erfolgte die

radioaktive Markierung des gespaltenen DNA-Fragments unter Verwendung des Klenow-Fragments. Dazu wurden 300 ng DNA-Fragment mit dest. H₂O auf 34 µl aufgefüllt. Es wurden 5 µl NEB-Puffer 2 (New England Biolabs, Ipswich, USA), 5 µl dNTP-Stocklösung (je 1,0 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP), 5 µl α³²P-dATP (Hartmann Analytics, Braunschweig, Deutschland) und 5 U Klenow-Fragment (New England Biolabs, Ipswich, USA) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die radioaktiv markierte DNA anschließend über das Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die spezifische Aktivität des markierten DNA-Fragments wurde in einem Scintillationszähler bestimmt und unterschritt einen Wert von 5 x 10⁵ cpm/µl nicht. Ansätze für eine Gelretardationsanalyse setzten sich wie folgt zusammen: 0,1 ng des markierten DNA-Fragments wurde mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer (pH 7,5) und steigenden Mengen (0 pmol; 0,73 pmol; 1,45 pmol bzw. 2,9 pmol) gereinigtem Trx/His₆-AlsR auf Eis zusammengegeben. Mit dest. H₂O wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die gesamten Ansätze auf ein nicht-denaturierendes 6%iges Acrylamidgel aufgetragen und 90 min bei 120 V in 0,5 x TBE-Puffer separiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und für ein bis 16 Stunden auf einen Phosphor-Screen aufgelegt. Analyse und Digitalisierung des Screens erfolgten über einen Fluoreszenz-Laserscanner.

1 x Reaktionspuffer (pH 7,5)	25,0 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100,0 mM	KCl
	5,0 mM	MgCl ₂
	1,0 mM	DTT
	0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
	50,0 µg/ml	BSA
	4,0 µg/ml	Poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
	5,0 %(v/v)	Glyzerin
		in dest. H ₂ O
6%-Acrylamidgel	6,0 %(v/v)	Acrylamid
	5,0 %(v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08 %(v/v)	APS-Lösung
	0,004 %(v/v)	TEMED
		in dest. H ₂ O
10 x TBE-Puffer	90,0 mM	Tris-HCl
	90,0 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
		in dest. H ₂ O

3.6.23.2 EMSA mit doppelsträngigen Oligonukleotiden

Um die in eine Gelretardationsanalyse eingesetzte DNA-Menge besser quantifizieren zu können, wurden synthetische, einander komplementäre Oligonukleotide benutzt. Mit diesen wurden dsDNA-Fragmente hergestellt, welche der *alsSD* Promotorregion von Position -89 bis -48 (5'-TTCCATAGGTTAATAATTCGTATTACATATTAATCATAAGGC-3') in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons entsprachen. Mit den zwei einander komplementären Oligonukleotiden EH219 und EH220 (Tab. 8) wurde durch Hybridisierung ein dsDNA-Molekül generiert, welches ein WT *alsSD* Promotorfragment repräsentierte. Auf die gleiche Weise wurde auch mit den Oligonukleotiden EH223 und EH224 (Tab. 8) verfahren, welche an den Positionen -76/-75 und -59/-58 jeweils Basenaustausche (TA → GG) erhielten. So entstand ein *alsSD* Promotorfragment mit definierten Punktmutationen (5'-TTCCATAGGTTAAGGATTCGTATTACATATGGATCATAAGGC-3').

Zur Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide wurden die entsprechenden Oligonukleotidpaare mit einer Konzentration von jeweils 10 mM in Hybridisierungspuffer für 10 min bei 95 °C erhitzt und über einen Zeitraum von drei Stunden auf RT abgekühlt. Das resultierende 41 bp lange dsDNA-Fragment wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert. Für die radioaktive Markierung der dsDNA-Fragmente wurden 10 pmol derselbigen mit 5 µl γ -³²P ATP [≥ 3000 mCi/mmol; 10 mCi/ml] (Hartmann Analytics, Braunschweig, Deutschland), 3 µl 10 x Polynukleotidkinase-Puffer (New England Biolabs, Ipswich, USA) und 20 U Polynukleotidkinase (New England Biolabs, Ipswich, USA) versetzt und mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und die Polynukleotidkinase anschließend 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Reinigung der DNA erfolgte mit dem Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die spezifische Aktivität der markierten dsDNA-Fragmente wurde in einem Scintillationszähler bestimmt und unterschritt einen Wert von $2,5 \times 10^5$ cpm/µl nicht. Ansätze für eine Gelretardationsanalyse setzten sich wie folgt zusammen: 0,1 pmol des markierten dsDNA-Fragments wurden mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer (pH 7,5) und steigenden Mengen gereinigtem AlsR (0 pmol bis 87 pmol) auf Eis zusammengegeben. Mit dest. H₂O wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde jeweils das gesamte Volumen der Ansätze auf ein nicht-denaturierendes 6%iges Acrylamidgel aufgetragen und 90 min bei 120 V in 0,5 x TBE-Puffer

separiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und auf einen Phosphor-Screen für ein bis 16 Stunden aufgelegt. Analyse und Digitalisierung des Screens erfolgten über einen Fluoreszenz-Laserscanner.

Um eine spezifische Bindung von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment sicherzustellen, wurde Kompetitor-DNA in steigenden Mengen zu den Ansätzen zugegeben. Die Kompetitor-DNA hatte entweder die gleiche Sequenz wie das radioaktiv-markierte WT *alsSD* Promotorfragment oder das *alsSD* Promotorfragment mit den definierten Punktmutationen, war jedoch in beiden Fällen nicht radioaktiv markiert. Elektrophorese, Analyse und Digitalisierung erfolgten wie oben beschrieben.

Um den Effektor von AlsR definieren zu können, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt, bei denen den Ansätzen Acetat, Lactat oder Acetoin in verschiedenen Mengen (von 0 mM bis 100 mM) zugegeben wurde. Des Weiteren wurden Ansätze durchgeführt, bei dem der pH-Wert des 10 x Reaktionspuffers auf 6,0 abgesenkt war. Elektrophorese, Analyse und Digitalisierung erfolgten wie oben beschrieben.

Hybridisierungspuffer	125,0	mM	NaCl
	10,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	0,1	mM	EDTA (pH 8,0)
			in dest. H ₂ O
1 x Reaktionspuffer (pH 7,5)	25,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100,0	mM	KCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	1,0	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA (pH 8,0)
	50,0	µg/ml	BSA
	4,0	µg/ml	Poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
	5,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O
1 x Reaktionspuffer (pH 6,0)	25,0	mM	Tris-HCl (pH 6,0)
	100,0	mM	KCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	1,0	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA (pH 8,0)
	50,0	µg/ml	BSA
	4,0	µg/ml	Poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
	5,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O

6%-Acrylamidgel	6,0	%(v/v)	Acrylamid
	5,0	%(v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08	%(v/v)	APS-Lösung
	0,004	%(v/v)	TEMED
			in dest. H ₂ O
10 x TBE-Puffer	90,0	mM	Tris-HCl
	90,0	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
			in dest. H ₂ O

3.6.24 DNaseI-Protektionsanalysen (DNaseI-Footprint, „DNaseI-Footprinting Analysis“) mit gereinigtem AlsR aus *Bacillus subtilis*

Um die genaue Bindestelle zu definieren, an welche AlsR im *alsSD* Promotor bindet, wurden DNaseI-Protektionsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde zunächst per PCR ein dsDNA-Fragment hergestellt, bei welchem ein Strang mit Digoxigenin (DIG) markiert war und welches die potentielle Bindestelle für den zu untersuchenden transkriptionellen Regulator enthielt. Dieses DNA-Fragment wurde mit dem Enzym DNaseI fragmentiert. DNaseI fragmentiert sowohl ssDNA als auch dsDNA zufällig in Mono- und Oligonukleotide, welche bei der späteren Detektion der Digoxigenin-Markierung ein spezifisches Bandenmuster erzeugen. Bereiche der DNA, die von einem Protein gebunden wurden, sind vor der Fragmentierung geschützt und erscheinen bei der Detektion als Bereich ohne Bandenmuster. Dieser geschützte Bereich wird als „Fußabdruck“ oder „Footprint“ bezeichnet.

Für die DNaseI-Protektionsanalysen mit *B. subtilis* AlsR wurde mittels PCR ein DNA-Fragment hergestellt, welches dem Bereich des *alsSD* Promotors von Position -200 bis Position +54 entsprach. Hierbei wurden jeweils ein DIG-markiertes und ein nicht-markiertes Oligonukleotid in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen waren DIG-EH174 und EH175 für den kodierenden DNA-Strang sowie EH174 und DIG-EH175 für den nicht-kodierenden DNA-Strang (Tab. 9). Als Matrize diente das Plasmid *palsS-lacZ* (Tab. 5). Jeweils 35 ng des DIG-markierten PCR-Fragments wurden mit 2 µl 10 x Footprintpuffer versetzt und es wurde in steigenden Mengen (0 - 1,45 pmol) gereinigtes AlsR zugegeben. Die Ansätze wurden mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zur Fragmentierung der DNA 0,4 U DNaseI (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zugefügt. Die Fragmentierung wurde nach 20 sec durch die Zugabe von 50 µl Stop-Lösung gestoppt. Zur Reini-

gung der Ansätze wurde die DNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten die Zugabe von 25 µl Ammoniumacetatlösung, 1 µl Glykogenlösung und 1 ml 100 % EtOH. Die DNA wurde zur Fällung für mindestens 30 min bei -20 °C gelagert und anschließend sedimentiert (20 min, 18.000 g, RT). Die sedimentierte DNA wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und schließlich in 3 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA) resuspendiert.

Zur genauen Bestimmung der Sequenz, an die AlsR im *alsS* Promotor bindet, wurde parallel zu den DNaseI-Protektionsanalysen eine Sequenzierungsreaktion mit dem Plasmid p-200*alsS-lacZ* (Tab. 5) durchgeführt. Dieses deckt den gesamten für die DNaseI-Protektionsanalysen verwendeten *alsSD* Promotorbereich ab. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Ohio, USA) nach Vorschrift des Herstellers. Nach Abschluss der Sequenzierungsreaktion wurde jeder der Ansätze mit 4 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA) versetzt. Die DNaseI-Protektionsanalysen sowie die Sequenzierungsreaktionen wurden 2 min bei 85 °C denaturiert und anschließend auf ein Acrylamid-Harnstoffgel aufgetragen. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 3 µl. Die Elektrophorese erfolgte bei 2.500V (150 W, 21 mA) für die Dauer von ca. zwei Stunden in 1 x TBE-Puffer.

1 x Footprintpuffer	25,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100,0	mM	KCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	1,0	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA (pH 8,0)
	5,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O
Stop-Lösung	15,0	µM	EDTA
	10,0	µg/ml	Hefe Carrier tRNA (Invitrogen, Carlsbad, USA)
			in dest. H ₂ O
Acrylamid-Harnstoffgel	7,0	M	Harnstoff
	6,0	%(v/v)	Acrylamid
	10,0	%(v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08	%(v/v)	APS-Lösung
	0,004	%(v/v)	TEMED
			in dest. H ₂ O

10 x TBE-Puffer	90,0	mM	Tris-HCl
	90,0	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
	in dest. H ₂ O		

3.6.25 Kontaktblot der DNaseI-Protektionsanalysen (DNaseI-Footprint, „DNaseI-Footprinting Analysis“) und Detektion

Die Übertragung der DNaseI-Protektionsanalysen aus dem Acrylamid-Harnstoffgel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) erfolgte mittels eines Kontaktblots. Dazu wurde die Nylonmembran luftblasenfrei auf dem Gel platziert. Darüber wurden vier Lagen 3MM Whatman-Chromatographiepapier (GE-Healthcare, München, Deutschland) und eine Glasplatte positioniert und mit einem 500 g Gewicht beschwert. Die Inkubation des Kontaktblots erfolgte für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurde die DNA per UV-Crosslink kovalent an die Membran gebunden. Für die Detektion der DIG-markierten DNA wurde die Membran erst 1 min in Waschpuffer und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen 40 min in Blockinglösung bei RT gewaschen. Zur Detektion eingebauter DIG-markierter Nukleotide dienten Anti-DIG-Fab-Fragmente mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:10.000 in Blockinglösung verdünnt, auf die Membran gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörperfragmente wurden mit Maleinsäurepuffer (pH 8,0) durch viermaliges Waschen für je 10 min bei RT von der Membran entfernt. Das Beträufeln der Membran mit dem Substrat CDPStar® (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), das zuvor im Verhältnis 1:100 mit Substratpuffer versetzt wurde, bewirkte eine enzymatische Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase. Dies führte zu einer Lichtemission, welche durch Auflegen eines Röntgenfilms (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) detektiert werden konnte. Der Röntgenfilm wurde entwickelt und zur Digitalisierung eingescannt.

Blockinglösung	10,0	%(w/v)	Blocking Reagent (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in Maleinsäurepuffer (pH 7,5)
Maleinsäurepuffer (pH 8,0)	100,0	mM	Maleinsäure
	3,0	M	NaCl
	7,0	g/l	NaOH
	0,3	%(v/v)	Tween 20
	pH 8,0; in dest. H ₂ O		

Maleinsäurepuffer (pH 7,5)	100,0	mM	Maleinsäure
	3,0	M	NaCl
	7,0	g/l	NaOH
	0,3 % (v/v)		Tween 20
	pH 7,5; in dest. H ₂ O		
Substratpuffer	100,0	mM	TrisHCl (pH 9,5)
	100,0	mM	NaCl
	in dest. H ₂ O		
Waschpuffer	20,0	mM	Na ₂ HPO ₄
	0,5	M	EDTA
	1,0 % (w/v)		SDS
	pH 7,2; in dest. H ₂ O		

3.6.26 *In vitro*-Transkriptionsanalysen mit gereinigtem AlsR und gereinigter RNA Polymerase (RNAP)

In vitro Transkriptionsanalysen dienen zur Beantwortung der Fragestellung, ob ein transkriptioneller Regulator zusammen mit einer RNA Polymerase (RNAP) in der Lage ist, *ex vivo* die Transkription eines Zielgens bzw. Zieloperons zu initiieren. In diesem Fall wurde untersucht, ob *B. subtilis* AlsR in der Lage ist, ausgehend von einer entsprechenden DNA-Matrize in Kombination mit der *Bacillus*-eigenen RNAP die Transkription des *alsSD* Operons zu vermitteln.

Als Matrize der *in vitro*-Transkription diente ein DNA-Fragment, welches der *alsSD* Sequenz von Position -116 bis +105 in Bezug auf dessen Transkriptionsstartpunkt entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde per PCR mit den Oligonukleotiden EH128 und EH235 (Tab. 10) und dem Plasmid p-200*alsS-lacZ* (Tab. 5) als Matrize amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit dem Gelextraction-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers gereinigt. Jeder *in vitro*-Transkriptionsansatz enthielt 8,0 nM DNA-Matrize, 1,0 nM AlsR, jeweils 100 µM ATP, GTP und UTP sowie 10 µM CTP und 0,5 µCi [α^{32} -P]-CTP (≥ 3000 Ci/ mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) und wurde für 20 min bei RT in einem Endvolumen von 9 µl 1 x Transkriptionspuffer inkubiert. Die Transkription wurde durch die Zugabe von 25 nM gereinigter *B. subtilis* RNAP initiiert. Die Reaktionen wurden 20 min bei 37 °C inkubiert und die Transkription wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Solution (USB, Ohio, USA) gestoppt. Die Transkripte wurden in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel für ca. drei Stunden bei 170 V in 1 x TBE-Puffer separiert. Das Auftragsvolumen betrug 10 µl. Als Längenstandard diente der

Decade Marker (Ambion Inc., Austin, USA), der nach Vorschrift des Herstellers hergestellt wurde. Das Auftragsvolumen des Decade Markers betrug ebenfalls 4 µl. Das Gel wurde auf einen Röntgenfilm (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) aufgelegt und anschließend für mindestens drei Tage bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und zur Digitalisierung eingescannt.

Um den Effektor von AlsR definieren zu können, wurden *in vitro*-Transkriptionsanalysen durchgeführt, bei denen den Ansätzen Acetat, Lactat oder Acetoin in verschiedenen Mengen (von 0 mM bis 100 mM) zugegeben wurde. Des Weiteren wurden Reaktionen durchgeführt, bei denen der pH-Wert des Transkriptionspuffers auf 6,0 abgesenkt war. Elektrophorese, Analyse und Digitalisierung erfolgten wie oben beschrieben.

10 x TBE-Puffer	90,0	mM	Tris-HCl
	90,0	mM	Borsäure
	2,5	mM	EDTA
			in dest. H ₂ O
Acrylamid-Harnstoffgel	7,0	M	Harnstoff
	6,0	%(v/v)	Acrylamid
	10,0	%(v/v)	10 x TBE-Puffer
	0,08	%(v/v)	APS-Lösung
	0,004	%(v/v)	TEMED
			in dest. H ₂ O
1 x Transkriptionspuffer (pH 7,5)	25,0	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10,0	mM	KCl
	0,5	mM	MgCl ₂
	0,5	%(v/v)	Glyzerin
	0,1	mM	DTT
	0,01	mM	EDTA
	5,0	µg/ml	BSA
	0,08	U/µl	RNaseOut (Invitrogen, Carlsbad, USA)
			in dest. H ₂ O
1 x Transkriptionspuffer (pH 6,0)	25,0	mM	Tris-HCl (pH 6,0)
	10,0	mM	KCl
	0,5	mM	MgCl ₂
	0,5	%(v/v)	Glyzerin
	0,1	mM	DTT
	0,01	mM	EDTA
	5,0	µg/ml	BSA
	0,08	U/µl	RNaseOut (Invitrogen, Carlsbad, USA)
			in dest. H ₂ O

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 Produktion von *Bacillus subtilis* AlsR in *Escherichia coli*

3.7.1.1 Expressionstests für die AlsR Proteinproduktion

Um die optimalen Bedingungen zu bestimmen, bei denen eine Produktion von löslichem AlsR Protein erfolgt, wurden Expressionstests durchgeführt. Für die Produktion und Reinigung von rekombinantem AlsR aus *B. subtilis* wurde der Produktionsstamm *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL (Tab. 4) verwendet. Eine Übernachtskultur dieses Stamms, der zuvor mit dem Plasmid pET32a-AlsR (Tab. 5) für die Produktion von Trx/His₆-AlsR (AlsR aus *B. subtilis* mit einem His₆-Tag zur Affinitäts-Chromatographie, einem Trx-Tag zur Steigerung der Proteinlöslichkeit sowie einem in diesem Fall irrelevanten S-Tag) oder pET52bTrx-AlsR für die Produktion von Trx/*Strep*-AlsR (AlsR aus *B. subtilis* mit einem *Strep*-Tag zur Affinitäts-Chromatographie und einem Trx-Tag zur Steigerung der Proteinlöslichkeit) transformiert worden war, wurde für die Inokulation von drei mal 100 ml LB-Medium benutzt, welches Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) enthielt. Die Inokulation erfolgte im Verhältnis 1:100. Die Kulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8-1,0 wurde die rekombinante Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 300 µM induziert. Ein Ansatz wurde weiter bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, die beiden anderen bei 25 °C bzw. 17 °C und 180 rpm. Zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinproduktion sowie über einen folgenden Zeitraum von vier Stunden wurden stündlich Proben genommen. Des Weiteren wurde nach 16stündiger Proteinproduktion eine Probe genommen. Die Proben enthielten stets eine gleiche Anzahl von Zellen entsprechend einer OD₅₇₈ von 2,0. Die Proben wurden sedimentiert (5 min, 18.000 x g, RT), in 40 µl Lysispuffer resuspendiert und anschließend zur Lyse der Zellen 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die löslichen wurden von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt (90 min, 18.000 g, 4 °C). Der Überstand, der die lösliche Fraktion darstellte, wurde in ein separates Reaktionsgefäß gegeben. Das Sediment, welches die unlösliche Fraktion darstellte, wurde in 40 µl deion. H₂O resuspendiert. Alle Proben wurden mit 15 µl Probenpuffer versetzt und per SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt.

Lysispuffer	60,0	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	40,0	mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	10,0	mM	KCl
	1,0	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	500,0	µg/ml	Lysozym in dest. H ₂ O
Probenpuffer	40,0	%(v/v)	Glyzerin
	2,0	mM	β-Mercaptoethanol
	110,0	mM	SDS
	3,0	mM	Bromphenolblau
	100,0	mM	Tris-HCl (pH 6,8) in dest. H ₂ O

3.7.1.2 Zellwachstum für die AlsR Proteinproduktion

Für die Produktion und Reinigung von rekombinantem AlsR aus *B. subtilis* wurde der Produktionsstamm *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL (Tab. 4) verwendet. Eine Übernachtskultur dieses Stamms, der zuvor entweder mit dem Plasmid pET32a-AlsR (Tab. 5) für die Produktion von Trx/His₆-AlsR oder mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR (Tab. 5) für die Produktion von Trx/*Strep*-AlsR transformiert worden war, wurde für die Inokulation von 6 x 500 ml LB-Medium benutzt, welches Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) enthält. Die Inokulation erfolgte im Verhältnis 1:100. Die Kulturen wurden in sechs 1 l Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 - 1,0 wurde die rekombinante Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 300 µM induziert. Die Proteinproduktion erfolgte für 16 Stunden bei 25 °C und 180 rpm. Anschließend wurden die Zellen durch Sedimentation (20 min, 4.000 g, 4 °C) geerntet.

3.7.1.3 Zellaufschluss

Die Zellsedimente wurden auf Eis in 30 ml Waschpuffer resuspendiert und mittels French Press® bei einem Druck von 19.200 psi aufgeschlossen. Nach erfolgtem Aufschluss wurde die Fraktion, welche die löslichen Proteine enthielt, von unlöslichen Fragmenten durch deren Sedimentation (1 h, 25.000 g, 4 °C) getrennt.

Waschpuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin in dest. H ₂ O

3.7.2 Affinitäts-Chromatographie von *Bacillus subtilis* AlsR

Der Überstand der Zentrifugation nach dem Zellaufschluss wurde bei 4 °C auf eine Tropfsäule zur Affinitäts-Chromatographie geladen. Für Proteine mit His₆-Tag wurden Ni²⁺-IDA-Tropfsäulen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), für Proteine mit *Strep*-Tag *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäulen (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) verwendet.

3.7.2.1 Affinitäts-Chromatographie von Trx/His₆-AlsR

Für die Reinigung von Trx/His₆-AlsR wurde Ni²⁺-IDA-Sepharose (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 5 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer bei 4 °C äquilibriert. Das SV betrug 3 ml. Anschließend wurde die äquilibrierte Tropfsäule bei 4 °C mit dem zellfreien Überstand beladen. Nach erfolgter Passage der Tropfsäule wurde diese bei 4 °C mit 10 SV Waschpuffer und anschließend mit 2 SV Prä-Elutionspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Tropfsäule zu entfernen. Das Trx/His₆-AlsR Fusionsprotein wurde bei 4 °C mit 3 SV His-Elutionspuffer eluiert und bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Affinitäts-Chromatographie wurde per SDS-PAGE verfolgt.

Waschpuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O

Prä-Elutionspuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
	2,5	mM	Imidazol
			in dest. H ₂ O

His-Elutionspuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
	250,0	mM	Imidazol
			in dest. H ₂ O

3.7.2.2 Affinitäts-Chromatographie von Trx/*Strep*-AlsR

Für die Reinigung von N-terminal *Strep*-getagtem AlsR aus *B. subtilis* wurde das Säulenmaterial *Strep*-Tactin-Superflow[®] (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) verwendet. Das Säulenmaterial mit einem Säulenvolumen (SV) von 3 ml wurde mit 5 SV Waschpuffer bei 4 °C äquilibriert. Der zellfreie Überstand wurde vor

der Ladung auf die äquilibrierte Tropfsäule zur Blockierung unspezifischer Bindungen 10 min bei 4 °C mit Avidin (2 mg/ml) inkubiert. Nach erfolgter Passage der Tropfsäule wurde diese bei 4 °C mit 10 SV Waschpuffer gewaschen, um verbliebene unspezifisch gebundene Proteine von der Tropfsäule zu eliminieren. Das Trx/*Strep*-AlsR Fusionsprotein wurde bei 4 °C mit 3 SV *Strep*-Elutionspuffer eluiert und bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Affinitäts-Chromatographie wurde per SDS-PAGE verfolgt.

Waschpuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O
<i>Strep</i> -Elutionspuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
	2,5	mM	Desthiobiotin
			in dest. H ₂ O

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigten Proteinen aus *Bacillus subtilis*

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Plus 2D Quant Kit (GE-Healthcare Europa, München, Deutschland) verwendet. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen.

3.7.4 Protease-Spaltung zur Entfernung der Affinitäts-Tags von AlsR-Fusionsproteinen

3.7.4.1 Enterokinase-Spaltung zur Entfernung des Tags von Trx/His₆-AlsR

Zur Entfernung des Tags von Trx/His₆-AlsR wurde das eluierte Protein bei 4 °C mit der Protease Enterokinase (Novagen, Madison, USA) inkubiert. Hierbei wurden pro mg Fusionsprotein 50 U Enterokinase verwendet. Dadurch sollte der gesamte Tag mit einer Größe von ca. 15 kDa (bestehend aus dem Trx-Tag, einem S-Tag und dem His₆-Tag) abgespalten werden. Die Dauer der Inkubation wurde variiert. Verlauf und Erfolg der Protease-Spaltung wurden per SDS-PAGE verfolgt.

3.7.4.1 HRV-3C Protease-Spaltung zur Entfernung des Tags von Trx/*Strep*-AlsR

Zur Entfernung des Tags wurde das eluierte Trx/*Strep*-AlsR Protein über Nacht bei 4 °C mit der HRV-3C Protease (Novagen, Madison, USA) inkubiert. Hierbei wurden pro mg Fusionsprotein 200 U HRV-3C Protease verwendet, wodurch der

gesamte Tag mit einer Größe von ca. 13 kDa (bestehend aus dem Trx-Tag und dem *Strep*-Tag) abgespalten wurde. Die HRV-3C Protease lag als His-getaggtetes Fusionsprotein vor, so dass sie nach erfolgter Spaltung über eine Ni^{2+} -IDA-Tropfsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) von der AlsR-Proteinlösung getrennt werden konnte. Dazu wurde eine entsprechende Tropfsäule mit einem SV von 250 μl mit 5 SV *Strep*-Elutionspuffer bei 4 °C äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf diese Säule geladen. Die His-getaggte HRV-3C Protease band an die Säule, so dass im Durchfluss das gespaltene AlsR Protein sowie der abgespaltene Tag vorhanden waren. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Protease-Spaltung und der Abtrennung der Protease wurde per SDS-PAGE verfolgt.

3.7.5 Dialyse von gereinigtem und gespaltenem AlsR

Zur Entfernung des Desthiobiotins nach der Affinitäts-Chromatographie mittels *Strep*-Tag wurde die Proteinlösung gegen Waschpuffer dialysiert. Dafür wurde das Protein in Fraktionen zu je ca. 800 μl aliquotiert und in Mikro-Dialysierkapseln (H449.1; Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis 1:1000 für 90 min bei 4 °C dialysiert. Der verwendete Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hatte ein Ausschlussvolumen von 10 kDa. Die verwendeten Mikro-Dialysierkapseln erlaubten eine sanfte Dialyse der Proteinlösung, da die Dialyse lediglich an einer einzigen Grenzfläche stattfand. Nach der Dialyse wurde das Protein bei 4 °C gelagert.

Um nach der Dialyse auch den von der HRV-3C Protease (Novagen, Madison, USA) abgespaltenen Tag, bestehend aus einer Fusion aus Trx und *Strep*-Tag, vom gespaltenen AlsR Protein zu trennen, wurde die dialysierte Proteinlösung auf eine *Strep*-Tactin[®]-Säule, die zuvor mit 5 SV Waschpuffer äquilibriert wurde, geladen. Das SV betrug 500 μl . Die Fusion aus Trx- und *Strep*-Tag band an diese Säule, so dass der Durchfluss lediglich noch das komplett gespaltene AlsR Protein enthielt. Die Proteinlösung wurde bei 4 °C gelagert. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Versuche mit AlsR Protein durchgeführt, das diesen Reinheitsgrad besaß.

Waschpuffer	100,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150,0	mM	NaCl
	10,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O

3.7.6 Analytische Gelpermeations-Chromatographie von AlsR

Mittels Gelpermeations-Chromatographie können Moleküle anhand ihrer molekularen Masse getrennt werden. Dabei erfolgt die Elution großer Moleküle schneller als die kleiner. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Fähigkeit der Moleküle, in die Säulematrix zu diffundieren, welche aus porösen Kügelchen aus hochvernetztem Agarosegel mit kovalent gebundenem Dextran bestehen. Für die in dieser Arbeit durchgeführte analytische Gelpermeations-Chromatographie zur Bestimmung der relativen Molekularmasse (M_r) von AlsR wurde eine Superdex 200 HR 10/30-Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA; V_t = 24 ml, Trennleistung 10.000 - 600.000 M_r) in Kombination mit einem Äktapurifier™-System verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch bei RT mit Waschpuffer und mit einer Flussrate von 500 μ l/min. Es wurden 100 μ l einer 1,45 μ M AlsR-Lösung auf die Säule aufgetragen. Durch separate Läufe mit Eichproteinen bekannter M_r konnte die M_r von AlsR bestimmt werden. Geeicht wurde mit Albumin (M_r = 66.000), Carboanhydrase (M_r = 29.000) und Lysozym (M_r = 14.000).

3.7.7 Produktion und Reinigung der RNA Polymerase (RNAP) aus *Bacillus subtilis*

3.7.7.1 Zellwachstum für die Proteinproduktion

Für die Produktion und Reinigung der RNA Polymerase (RNAP) aus *B. subtilis* wurde der *B. subtilis*-Stamm MH5636 (Tab. 4) verwendet. Bei diesem Stamm ist an das 3'-Ende des *rpoC* Gens, welches für die β' -Untereinheit der *B. subtilis* RNAP kodiert, die kodierende Sequenz für einen 10 x His-Tag zur Affinitäts-Chromatographie fusioniert. Die restlichen Untereinheiten der RNAP sind nicht mit einem Fusionstag versehen, da sie mit der β' -Untereinheit co-gereinigt werden können.

Zur Produktion der RNAP aus *B. subtilis* wurden 6 x 500 ml LB-Medium (5 μ g/ml Chloramphenicol) mit einer Vorkultur des Stamms MH5636 im Verhältnis 1:100 inokuliert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 2,0 wurden die Zellen durch Sedimentation geerntet (30 min, 4.000 g, 4 °C).

3.7.7.2 Zellaufschluss

Die erhaltenen Zellsedimente wurden in Sonifikationspuffer gewaschen (10 min, 6.000 g, 4 °C). Die Zellsedimente wurden anschließend in 25 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde PMSF als Proteaseinhibitor in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, und die

Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Dabei waren die Geräteeinstellungen für die Sonotrode Sonoplus HD2070MS 50 % Impuls und 70 % Identität. Die Beschallungsdauer betrug 3 x 5 min unter Kühlung auf Eis. Nach jeder Beschallung erfolgte eine Pause von 5 min unter Kühlung auf Eis, um der entstandenen Reibungswärme entgegenzuwirken. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Fragmenten durch deren Sedimentation (60 min, 25.000 g, 4 °C) getrennt.

Sonifikationspuffer	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	300,0	mM	NaCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O
Resuspendierungspuffer	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	300,0	mM	NaCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	%(v/v)	Glyzerin
	4,0	mg/ml	Lysozym
			in dest. H ₂ O

3.7.7.3 Affinitäts-Chromatographie und Dialyse der RNAP aus *Bacillus subtilis*

Zur Reinigung der His₁₀-getaggten RNA-Polymerase aus *B. subtilis* wurde eine Ni²⁺-NTA-Tropfsäule mit einem Säulenvolumen (SV) von 1 ml benutzt. Dafür wurden 2 ml des Säulenmaterials Chelating Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Europe, München, Deutschland) mit 5 SV dest. H₂O äquilibriert und anschließend mit 2 SV 100 mM Nickelsulfatlösung beladen. Anschließend wurde die Säule mit 5 SV Sonifikationspuffer äquilibriert. Der Überstand der aufgeschlossenen und sedimentierten Zellen wurde bei 4 °C auf diese Säule geladen. Nach erfolgter Passage der Tropfsäule wurde diese bei 4 °C mit 10 SV Sonifikationspuffer und anschließend mit 10 SV Prä-Elutionspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Tropfsäule zu eliminieren. Die *B. subtilis* RNA Polymerase wurde bei 4 °C mit 4 SV Elutionspuffer eluiert und sofort gegen Storage-Buffer im Verhältnis 1:250 bei 4 °C dialysiert. Nach Inkubation über Nacht wurde die RNA Polymerase für weitere zwei Stunden gegen frischen Storage-Buffer dialysiert. Die RNAP-Lösung wurde bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der Affinitäts-Chromatographie wurde per SDS-PAGE verfolgt.

Nickelsulfatlösung	100,0	mM	NiSO ₄
			in dest. H ₂ O

Sonifikationspuffer	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	300,0	mM	NaCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O
Prä-Elutionspuffer	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	300,0	mM	NaCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	%(v/v)	Glyzerin
	30,0	mM	Imidazol
			in dest. H ₂ O
Elutionspuffer	50,0	mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	300,0	mM	NaCl
	5,0	mM	MgCl ₂
	20,0	%(v/v)	Glyzerin
	200,0	mM	Imidazol
			in dest. H ₂ O
Storage-Buffer	10,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	10,0	mM	MgCl ₂
	100,0	mM	KCl
	0,1	mM	EDTA (pH 8,0)
	50,0	%(v/v)	Glyzerin
			in dest. H ₂ O

3.7.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Behandlung eines Proteingemisches mit dem Detergenz SDS bewirkt eine Dissoziation aller Proteine in ihre Untereinheiten und eine vollständige Entfaltung der Peptidketten. Gleichzeitig werden alle Oberflächenladungen durch die Bindung von SDS an die Proteine neutralisiert. Die Proteine können dann ausschließlich entsprechend ihrer Größe separiert werden. Während der Elektrophorese werden die Proteine im Sammelgel fokussiert und anschließend ihrer molekularen Masse entsprechend im Trenngel separiert (Laemmli, 1970; Lodish *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit wurden 6%ige Sammelgele und 13,2%ige Trenngele eingesetzt. Die Gele mit einer Größe von 7 cm x 10 cm x 0,75 mm wurden mit Hilfe des Mini Protean 3 Systems (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Für die Elektrophorese wurden 40 µl Proteinlösung mit 15 µl Probenpuffer versetzt und das Proteingemisch 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde es zusammen mit dem Unstained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas, Burlington, Canada) auf das Gel aufgetragen und die Proteine 60 min bei 45 mA in

Elektrophoresepuffer getrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch deren Färbung mit Coomassie Blue. Dazu wurde das mit Färbelösung überschichtete Gel so lange erwärmt, bis die Färbelösung zu sieden begann. Es folgte eine 15minütige Inkubation unter leichter Rotation auf einer Schüttelplatte bei RT. Anschließend wurde das Gel entfärbt. Dies erfolgte durch Überschichten des Gels mit Entfärbelösung, gefolgt von einem Erwärmungsschritt bis zum Sieden dieser Lösung. Nach erneuter 15minütiger Inkubation wie oben angegeben wurde die Entfärbelösung erneuert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis die Proteinbanden deutlich ohne Hintergrund erkennbar waren. Die Gele wurden digitalisiert und anschließend getrocknet.

Sammelgel (6%ig)	6,0 %(v/v)	NF-Acrylamid/Bis (29:1)
	25,0 %(v/v)	Sammelgelpuffer
	0,01 %(v/v)	APS-Lösung
	0,001 %(v/v)	TEMED in dest. H ₂ O
Trenngel (13,2%ig)	13,2 %(v/v)	NF-Acrylamid/Bis (29:1)
	25,0 %(v/v)	Trenngelpuffer
	0,01 %(v/v)	APS-Lösung
	0,001 %(v/v)	TEMED in dest. H ₂ O
Sammelgelpuffer	0,4 %(w/v)	SDS
	1,5 M	Tris-HCl (pH 6,8) in dest. H ₂ O
Trenngelpuffer	0,4 %(w/v)	SDS
	1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8) in dest. H ₂ O
APS-Lösung	10,0 %(w/v)	Ammoniumperoxodisulfat in dest. H ₂ O
Elektrophoresepuffer	385,0 mM	Glyzin
	0,1 %(w/v)	SDS
	50,0 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
		in dest. H ₂ O
Probenpuffer	40,0 %(v/v)	Glyzerin
	2,0 mM	β-Mercaptoethanol
	110,0 mM	SDS
	3,0 mM	Bromphenolblau
	100,0 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
		in dest. H ₂ O

Färbelösung	10,0 %(v/v)	Essigsäure
	1,0 g/l	Coomassie Brilliant Blue
	in deion. H ₂ O	
Entfärbelösung	30,0 %(v/v)	Ethanol
	10,0 %(v/v)	Essigsäure
	in deion. H ₂ O	

3.7.9 Messung der Expressionsstärke von Reportergenfusionen mittels des β -Galaktosidase Enzymtests

Zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden die entsprechenden *B. subtilis* Stämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert. Hierfür wurde zunächst eine Vorkultur des entsprechenden *B. subtilis* Stamms in LB-Medium angesetzt. Nach achtstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde mit 1 ml dieser Vorkultur eine Vorkultur in SMM-Medium inokuliert. Diese wurde für 16 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden die Hauptkulturen beimpft. Für aerobe Kulturen wurden 100 ml beimpftes SMM-Flüssigmedium in 300 ml Schikanekolben bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Start-OD₅₇₈ von aeroben Kulturen betrug 0,05. Anaerobe Kulturen wurden in vollständig gefüllten 125 ml Transfusionsflaschen, die mit einem Silikonseptum und einer Schraubdichtung verschlossen waren, bei 100 rpm und 37 °C inkubiert. Die Start-OD₅₇₈ von anaeroben Kulturen betrug 0,3. Wenn angezeigt, erfolgte die Zugabe von Zusatzstoffen in Endkonzentrationen von 10 mM (Nitrat) oder 40 mM (Acetat, Lactat, Acetoin, Butandiol, Glutamat, Succinat) sowie die Reduktion des pH-Werts des Mediums auf 6,0. Jeweils 4 ml Probe für den β -Galaktosidase Enzymtest wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung genommen (exponentielle Wachstumsphase, Übergang zur stationären Phase und Stationärphase). Die Proben für den β -Galaktosidase Test wurden für 5 min auf Eis inkubiert, die Zellen von je 2 ml sedimentiert (18.000 g, 4°C, 20 min), der Überstand entfernt und das Zellsediment bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in *B. subtilis* wurde basierend auf dem Verfahren für *E. coli* durchgeführt (Miller, 1972). Bei diesem Enzymtest wandelt die β -Galaktosidase das Substrat o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (oNPG) in o-Nitrophenolat um, welches photometrisch bei 420 nm gemessen werden kann.

Zur Durchführung des β -Galaktosidase Aktivitäts-Tests wurden die sedimentierten Proben in je 800 μ l Z-Puffer resuspendiert. Zur Zellpermeabilisierung wurden 5 μ l DNase-Lysozymlösung hinzugegeben, es wurde gut gemischt und 30 min bei 37 °C

schüttelnd inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl oNPG-Lösung (4 mg/ml) gestartet. Bei beginnender Gelbfärbung, spätestens jedoch nach 1 h, wurde die Reaktion mit 500 µl Stop-Lösung gestoppt. Die Zeit von der Zugabe der oNPG-Lösung bis zum Abstoppen wurde gemessen und die OD₄₂₀ und OD₅₅₀ photometrisch bestimmt. Die Berechnung der β-Galaktosidaseaktivität in Enzymeinheiten (Miller-Units) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$[\text{Miller-Units}] = \frac{\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})}{\text{OD}_{578} \times V \times t} \times 1000$$

OD₄₂₀: Optische Dichte der Reaktion bei 420 nm

OD₅₅₀: Optische Dichte der Reaktion bei 550 nm

OD₅₇₈: Optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension bei 578 nm

V [ml]: Volumen der eingesetzten Zellsuspension

t [min]: Zeit der Enzymreaktion bis zum Abstoppen

Z-Puffer	60,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	40,0 mM	NaH ₂ PO ₄
	10,0 mM	KCl
	1,0 mM	MgSO ₄
	50,0 mM	β-Mercaptoethanol
		in dest. H ₂ O
oNPG-Lösung	4,0 mg/ml	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
		in dest. H ₂ O
Stop-Lösung	1,0 M	Na ₂ CO ₃
		in dest. H ₂ O
DNase-Lysozym-Lösung	20,0 %(v/v)	DNase-Lösung
	7,0 mg/ml	Lysozym
		in Z-Puffer
DNase-Lösung	25,0 mg/ml	DNase
	3,0 M	Natriumacetat pH 4,8
		in dest. H ₂ O

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Produktion und Reinigung von *Bacillus subtilis* AlsR

4.1.1 Produktion und Reinigung von Trx/His₆-AlsR

Transkriptionelle Regulatoren wie AlsR in *B. subtilis* sind lediglich in geringen Mengen pro Zelle vorhanden. Daher wird für die heterologe Produktion die Expression des *alsR* Gens unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors in *E. coli* bevorzugt. Für die AlsR Produktion wurde das Expressionsplasmid pET32a ausgewählt. Das *alsR* Gen wurde in dieses Plasmid kloniert, was im Expressionsplasmid pET32a-AlsR resultierte. Hier wird die Expression über einen induzierbaren T7-Promotor reguliert, und AlsR wird als His₆-AlsR Fusionsprotein produziert. Der N-terminale His₆-Tag bildet durch spezifische Wechselwirkungen mit Ni²⁺-Ionen einen stabilen Chelat-Komplex, was die Reinigung eines His₆-getaggtten Fusionsproteins über eine Affinitäts-Chromatographie ermöglicht. Die Ni²⁺-Ionen sind hierbei durch eine chelatbildende Verbindung (Iminodiessigsäure, IDA oder Nitrilotriessigsäure, NTA) komplexiert, welche kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden ist. So wird eine effiziente Einstufen-Reinigung des His₆-AlsR Proteins aus der Cytoplasmafraktion der produzierenden *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen ermöglicht. Weiterhin enthält das Expressionsplasmid pET32a mit dem *trxA* Gen aus *E. coli* die kodierende Sequenz für einen N-terminalen Thioredoxin-Tag (Trx-Tag). Dies ist von besonderer Bedeutung, da bislang alle Versuche, AlsR aus *B. subtilis* heterolog in löslicher Form zu produzieren, fehl schlugen (Büttner, 2007). Die Fusion eines Proteins mit einem Trx-Tag führt oft zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins, so dass auch schnell aggregierende Proteine in löslicher Form produziert werden können (LaVallie *et al.*, 1993). Zusätzlich enthält pET32a die kodierende Sequenz für einen N-terminalen S-Tag, welcher ebenso wie der His₆-Tag einer Affinitäts-Chromatographie dient, jedoch in diesem Fall nicht genutzt und daher lediglich der Vollständigkeit halber aufgeführt wird. Da die Fusion mit einem Tag die Eigenschaften von AlsR verändern könnte, befindet sich zwischen der Aminosäuresequenz von AlsR und der des Tags eine Sequenz, die spezifisch von der Protease Enterokinase erkannt wird. Mit der Enterokinase kann der gesamte N-terminale Tag (bestehend aus Trx-Tag, His₆-Tag und S-Tag) abgespalten werden, so

dass schließlich gereinigtes AlsR ohne Tag vorliegt. AlsR besitzt dann als zusätzlichen Aminosäurerest am N-Terminus lediglich noch ein Alanin. Die Größe des gesamten N-terminalen Tags beläuft sich auf ca. 13 kDa. AlsR aus *B. subtilis* hat eine Größe von ca. 34,3 kDa, so dass das gesamte Fusionsprotein eine Größe von etwa 47 kDa besitzt (die Angabe für die molekulare Masse von AlsR wurde der Datenbank Genolist unter der URL <http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList> entnommen). Das gesamte Fusionsprotein wird hier als Trx/His₆-AlsR bezeichnet. Eine vereinfachte graphische Karte des Expressionsplasmids pET32a-AlsR ist in Abb. 10 dargestellt.

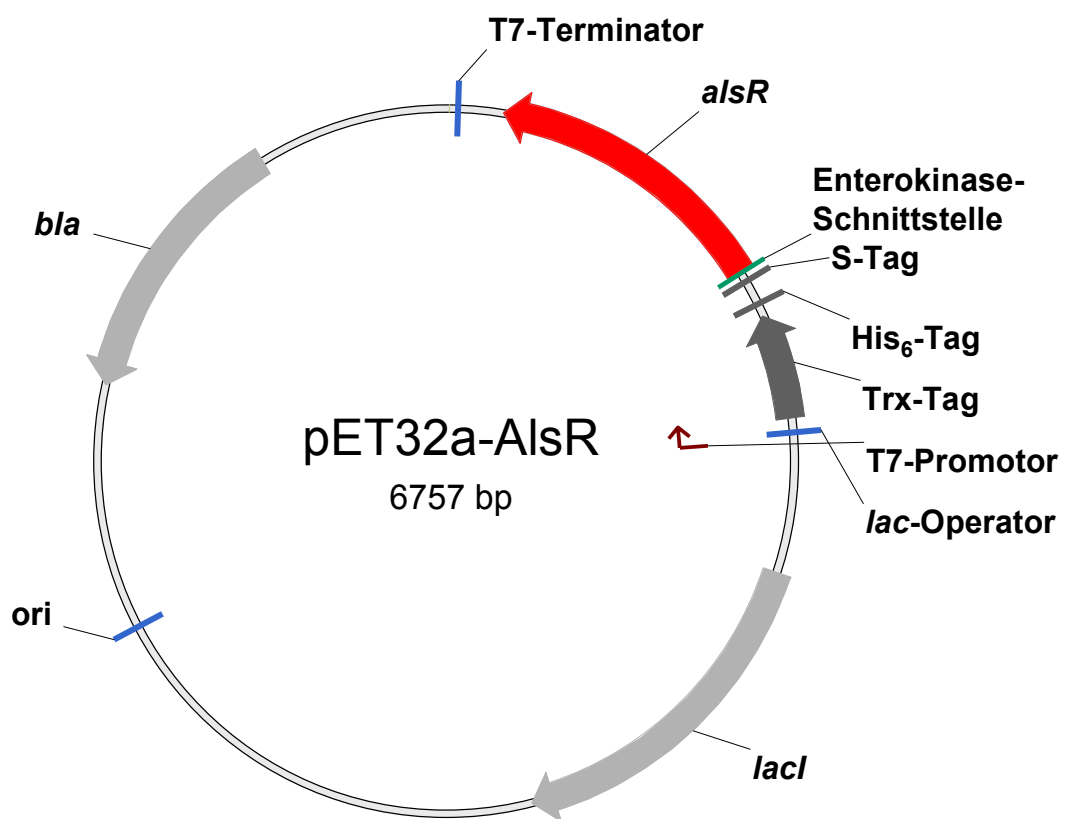


Abb. 10 Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pET32a-AlsR zur Produktion von Trx/His₆-AlsR (vereinfacht dargestellt). Der T7-Promotor wird durch einen Pfeil angezeigt. *lac*-Operator, T7-Terminator und „origin of replication“ (*ori*) sind als blaue Balken dargestellt. Der Trx-Tag ist als dunkelgrauer Pfeil, der His₆- und S-Tag jeweils als dunkelgrauer Balken und die Enterokinase-Schnittstelle als grüner Balken dargestellt. Das *alsR* Gen ist als roter Pfeil, die Gene für Ampicillin-Resistenz (*bla*) und Lac-Repressor (*lacI*) sind als hellgraue Pfeile dargestellt. Die Richtung der Pfeile gibt die Orientierung der entsprechenden Gene im Plasmid an.

Um festzustellen, ob die Fusion des *alsR* Gens mit dem *trxA* Gen zu einer Produktion von Trx/His₆-AlsR in löslicher Form führt, wurden Expressionstests durchgeführt. Hierfür wurden *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen mit dem Plasmid pET32a-AlsR transformiert. Die Proteinproduktion wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,8-1,0 durch Zugabe von 300 µM IPTG gestartet und die Zellen bei 37 °C und

180 rpm inkubiert. Zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinproduktion sowie über einen folgenden Zeitraum von vier Stunden wurde stündlich eine Probe genommen. Des Weiteren erfolgte eine Probennahme nach 16stündiger Inkubation der Zellen. Die Zellzahl in jeder Probe entsprach einer OD_{578} von 2. Nach erfolgter Lyse der Zellen und Trennung in ihre löslichen und unlöslichen Bestandteile erschien auf dem Gel eine Bande mit einer Größe von 45 kDa, die nur nach Induktion der Proteinproduktion auftauchte (Abb. 11). Diese entsprach nahezu der kalkulierten Größe des AlsR-Fusionsproteins (47 kDa) und somit wahrscheinlich Trx/His₆-AlsR.

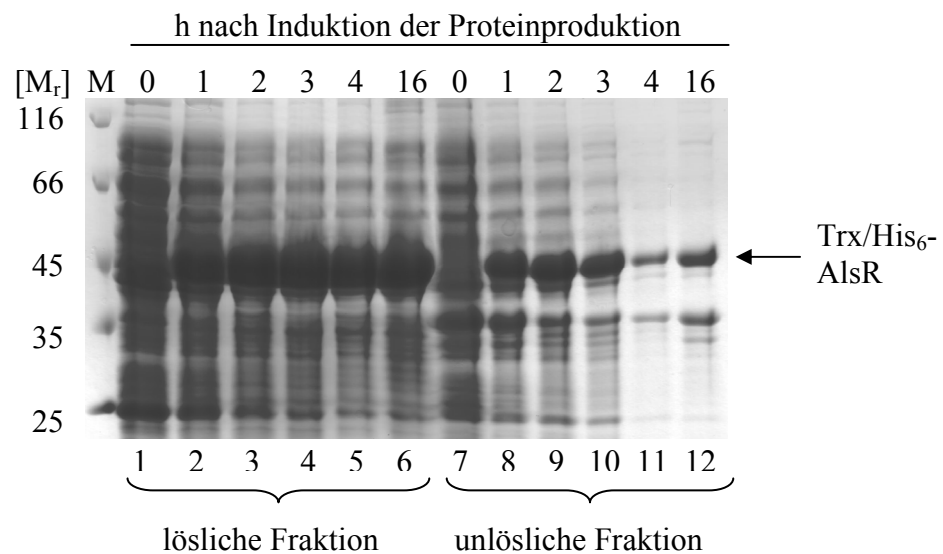
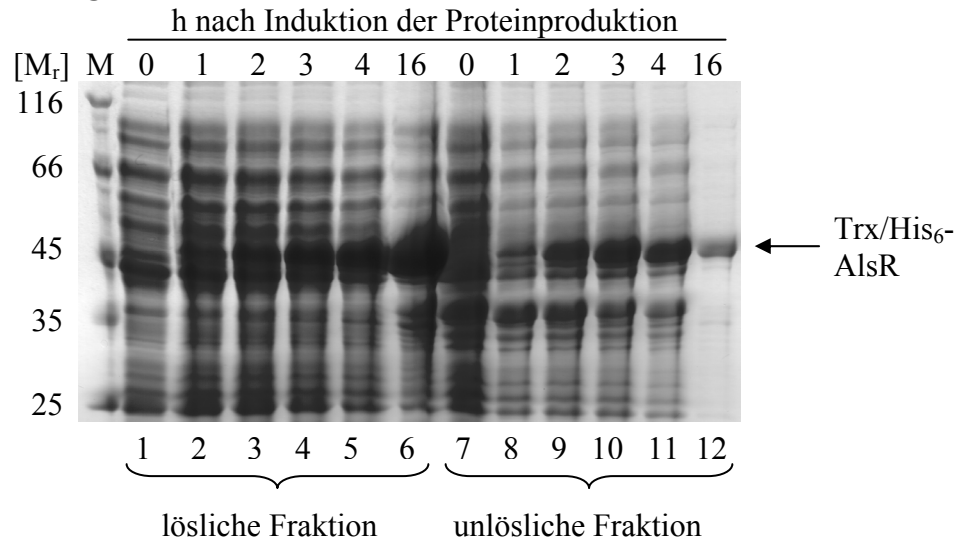


Abb. 11 SDS-PAGE Analyse der Testproduktion von rekombinantem Trx/His₆-AlsR bei 37 °C. Dargestellt sind die Proteingemische der cytoplasmatischen, löslichen Fraktion (Spur 1-6) sowie die der unlöslichen Fraktion (Spur 7-12) lysierter *E. coli* Zellen (entsprechend einer OD_{578} von 0,5) zum Zeitpunkt der Induktion (Spur 1 und 7) sowie 1 Stunde (Spur 2 und 8), 2 Stunden (Spur 3 und 9), 3 Stunden (Spur 4 und 10), 4 Stunden (Spur 5 und 11) und 16 Stunden (Spur 6 und 12) nach Induktion der Proteinproduktion mit 300 μ M IPTG. Der Großteil des ca. 45 kDa großen Trx/His₆-AlsR Fusionsproteins befindet sich in der löslichen Fraktion. Die größte Menge an Trx/His₆-AlsR ist nach 16-stündiger Produktion zu sehen. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinproduktion war weder in der löslichen noch in der unlöslichen Fraktion eine distinkte Proteinbande auf dem SDS-Gel bei einer Größe von 45 kDa erkennbar (Abb. 11, Spur 1 und 7). Bereits eine Stunde nach Induktion der Proteinproduktion wurde eine entsprechende Bande auf dem SDS-Gel sichtbar, welche bei fortschreitender Produktionsdauer in der löslichen Fraktion zu allen Zeitpunkten eine vergleichbare Intensität aufwies (Abb. 11, Spur 2-6). Da nach 16 Stunden die OD_{578} der proteinproduzierenden Zellen im Vergleich zur OD_{578} nach drei oder vier Stunden ca. um den Faktor 3 erhöht war, lag die insgesamt größte Menge an Trx/His₆-AlsR nach 16stündiger Proteinproduktion vor.

Um den Anteil an Trx/His₆-AlsR in der löslichen Fraktion noch zu erhöhen, wurden die Kultivierungsbedingungen modifiziert. Da die Kultivierungstemperatur einen Einfluss auf den Anteil löslich produzierten Proteins haben kann, wurden Testproduktionen bei 17 °C bzw. 25 °C durchgeführt (Abb. 12).

A 17 °C



B 25 °C

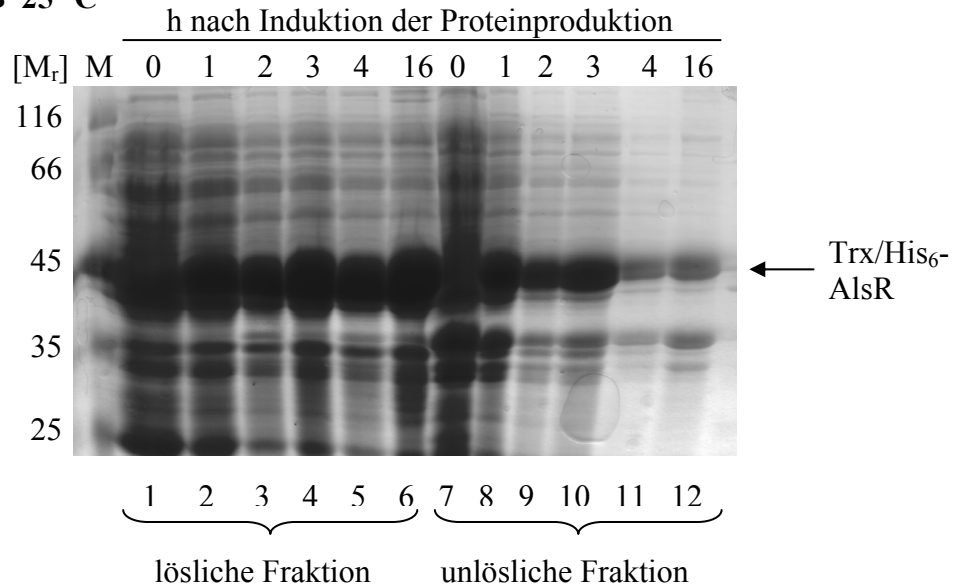


Abb. 12 SDS-PAGE Analyse der Testproduktion von rekombinantem Trx/His₆-AlsR bei 17 °C (A) und 25 °C (B). Dargestellt sind jeweils die Proteingemische der cytoplasmatischen, löslichen (Spur 1-6) und unlöslichen Fraktion (Spur 7-12) lysierter *E. coli* Zellen (entsprechend einer OD₅₇₈ von 0,5) zum Zeitpunkt der Induktion (Spur 1 und 7) sowie 1 Stunde (Spur 2 und 8), 2 Stunden (Spur 3 und 9), 3 Stunden (Spur 4 und 10), 4 Stunden (Spur 5 und 11) und 16 Stunden (Spur 6 und 12) nach Induktion der Proteinproduktion mit 300 µM IPTG. Der Großteil des ca. 45 kDa großen Trx/His₆-AlsR Fusionsproteins befindet sich bei beiden Produktionstemperaturen in der löslichen Fraktion. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Die Proteinproduktion bei 17 °C resultierte im Vergleich zu 37 °C nach 16stündiger Proteinproduktion in einer vergleichbar starken 45 kDa großen Bande im SDS-Gel (Abb. 11 und 12A). Jedoch war die OD₅₇₈ nach 16stündigem Zellwachstum bei 17 °C im Vergleich zu 37 °C um etwa die Hälfte geringer. Insgesamt wurde bei 17 °C somit weniger Trx/His₆-AlsR produziert als bei 37 °C. Auch der Anteil an unlöslichem Protein war durch die Proteinproduktion bei 17 °C nicht wesentlich geringer als bei 37 °C. Bei der Proteinproduktion, die bei 25 °C erfolgte, war die Ausbeute an löslichem Trx/His₆-AlsR zu allen Zeitpunkten vergleichbar mit der bei 37 °C (Abb. 11 und 12B). Der Anteil an unlöslichem Trx/His₆-AlsR und die OD₅₇₈ waren nach 16stündiger Proteinproduktion bei beiden Temperaturen ebenso vergleichbar, so dass für die Produktion von Trx/His₆-AlsR in größerem Maßstab von diesem Zeitpunkt an 25 °C als Produktionstemperatur und 16 Stunden als Produktionsdauer gewählt wurden.

Zur Produktion von Trx/His₆-AlsR wurden 4 x 500 ml LB-Medium mit einer Vorkultur *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen, die zuvor mit dem Plasmid pET32a-AlsR transformiert wurden, inokuliert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 1,0 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 300 µM IPTG gestartet und erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Fusionsprotein über eine Ni²⁺-IDA-Tropfsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 3 ml gegeben und so gereinigt (Abb. 13).

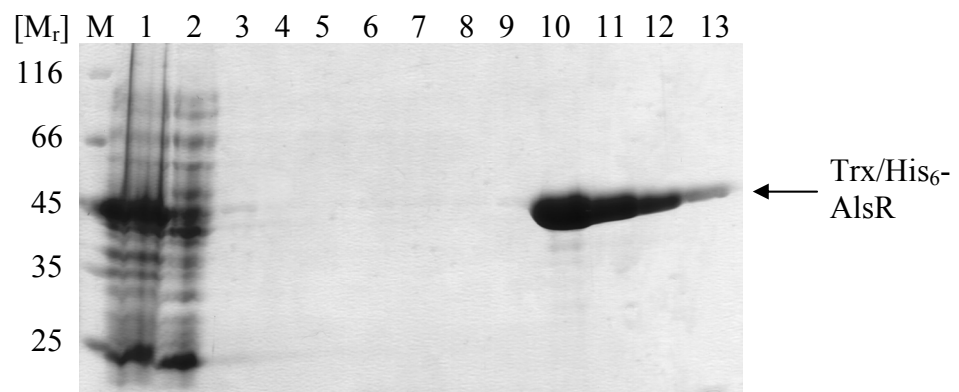


Abb. 13 SDS-PAGE Analyse der Produktion und Reinigung von Trx/His₆-AlsR. Dargestellt ist das Proteingemisch des Gesamtextrakts (Spur 1) lysierter *E. coli* Zellen (entsprechend einer OD₅₇₈ von 0,5) nach 16stündiger Proteinproduktion bei 25 °C, der Durchfluss der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss und Sedimentation der unlöslichen Fraktion sowie Passage einer Ni²⁺-IDA-Tropfsäule (Spur 2), zwei Waschfraktionen (Spur 3 und 4), drei Prä-Elutionsfraktionen (Spur 5-8) sowie fünf Elutionsfraktionen (Spur 9-13). Das Volumen der Ni²⁺-IDA-Tropfsäule betrug 3 ml. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Trx/His₆-AlsR konnte erfolgreich produziert und über eine Ni²⁺-IDA-Tropfsäule gereinigt werden. Nach 16 stündiger Produktion bei 25 °C war eine deutliche Bande mit einer Größe von 45 kDa erkennbar (Abb. 13, Spur 1). Nach Zellaufschluss und Sedimentation der unlöslichen Fraktion befand sich ein Teil des löslichen Trx/His₆-AlsR nach Passage der Ni²⁺-IDA-Tropfsäule im Durchfluss. Dies ist nicht durch ein Überladen der Tropfsäule erklärbar, da eine Erhöhung des Säulenvolumens um bis zu 200 % in einem vergleichbaren Ergebnis resultierte (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für das Vorhandensein von Trx/His₆-AlsR im Durchfluss könnte sein, dass das Fusionsprotein nicht in allen Fällen korrekt gefaltet war, so dass der His₆-Tag nicht an die Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix binden konnte. Kleinere Verunreinigungen konnten durch Waschen (Abb. 13, Spur 3 und 4) sowie durch Prä-Elution mit 2,5 mM Imidazol (Abb. 13, Spur 5-8) reduziert werden. Anschließend konnte Trx/His₆-AlsR mit 250 mM Imidazol in Fraktionen zu je 1 ml von der Ni²⁺-IDA-Tropfsäule eluiert werden (Abb. 13, Spur 9-13). Der größte Anteil des gereinigten Trx/His₆-AlsR Proteins befand sich in der zweiten und dritten Elutionsfraktion (Abb. 13, Spur 10 und 11). Aus 2 Liter *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen, die mit Plasmid pET32a-AlsR transformiert wurden, konnten insgesamt durchschnittlich 2 mg Trx/His₆-AlsR gereinigt werden.

4.1.2 Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von Trx/His₆-AlsR mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)

Um zu bestimmen, ob das produzierte und gereinigte Trx/His₆-AlsR an den Promotor des *alsSD* Operons binden kann, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt. Diese beruhen darauf, dass ein Protein-DNA-Komplex in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel aufgrund der Größe langsamer wandert als freie DNA. Die Bindung eines Proteins an ein Promotorfragment resultiert so in einer retardierten Bande im Acrylamidgel.

Durch *alsS-lacZ* Promotordeletionsanalysen war bereits bekannt, dass die Bindestelle für AlsR im *alsSD* Promotor innerhalb der ersten 86 bp in Bezug auf den Transkriptionsstart des *alsSD* Operons liegt (March, 2005). Daher wurde für die Gelretardationsanalysen per PCR-Amplifikation ein DNA-Fragment hergestellt, welches den *alsSD* Promotor von Position -86 bis +54 repräsentiert. Das amplifizierte *alsSD* Promotorfragment wurde radioaktiv endmarkiert und mit steigenden Mengen Trx/His₆-AlsR inkubiert. Die markierte DNA wurde ohne Trx/His₆-AlsR

(Abb. 14, Spur 1), sowie mit 0,725 pmol (Abb. 14, Spur 2), 1,45 pmol (Abb. 14, Spur 3) und 2,9 pmol Trx/His₆-AlsR inkubiert. Es war bei keiner der eingesetzten Proteinmengen eine retardierte Bande erkennbar. Dies bedeutet, dass das gereinigte Trx/His₆-AlsR nicht an das *alsSD* Promotorfragment gebunden hat (Abb. 14).

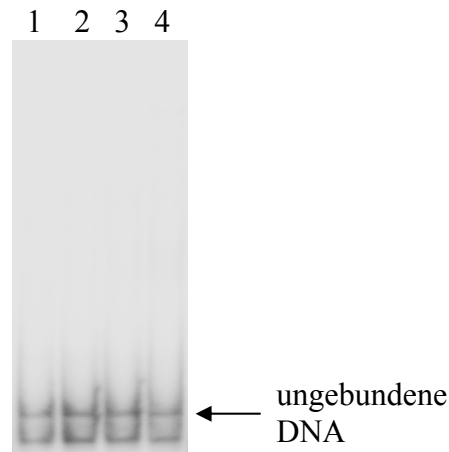


Abb. 14 Gelretardationsanalyse eines *alsSD* Promotorfragments mit steigenden Mengen gereinigtem Trx/His₆-AlsR. Dargestellt ist ein 138 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches Position -86 bis +54 des *alsSD* Promotors repräsentiert. Trx/His₆-AlsR wurde in steigenden Mengen zu jeweils 0,1 ng DNA gegeben. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von Trx/His₆-AlsR durchgeführt (Spur 1). Trx/His₆-AlsR wurde in folgenden Mengen zu den Ansätzen gegeben: Spur 2: 0,725 pmol, Spur 3: 1,45 pmol, Spur 4: 2,9 pmol. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet, auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaserscanner visualisiert. Trx/His₆-AlsR bindet nicht an das *alsSD* Promotorfragment.

Eine Erklärung dafür, dass Trx/His₆-AlsR nicht an das *alsSD* Promotorfragment gebunden hat, könnten die N-terminale Lokalisation und die Größe des Tags liefern. Da N-terminal die DNA-Bindedomäne von AlsR lokalisiert ist, könnte die DNA-Bindungs-fähigkeit des Proteins durch den ebenfalls N-terminal lokalisierten Tag, der eine Gesamtgröße von ca. 13 kDa besitzt, beeinträchtigt sein. Daher sollte der Tag des Trx/His₆-AlsR Proteins mit der Enterokinase abgespalten werden.

Die Enterokinase spaltet zwischen dem S-Tag und AlsR nach der spezifischen Erkennungssequenz AspAspAspAspLys (vgl. Abb. 10). Gespaltenes AlsR besitzt dann N-terminal lediglich noch ein Alanin als zusätzlichen Aminosäurerest. Zur Überprüfung der Enterokinase-Funktion wurde zusätzlich zu Trx/His₆-AlsR ein Kontrollprotein gespalten. Verlauf und Erfolg der Spaltung wurden per SDS-PAGE kontrolliert. Die SDS-PAGE Analyse zeigte, dass das Kontrollprotein mit einer Größe von 48 kDa (Abb. 15, Spur 1) nach 16stündiger Inkubation bei 4 °C mit 50 U Enterokinase pro mg Kontrollprotein nahezu vollständig in Fragmente zu 32 kDa und 16 kDa gespalten wurde (Abb. 15, Spur 2). Das Trx/His₆-AlsR Protein wurde für unter-

schiedlich lange Zeiträume mit der Enterokinase inkubiert. Als Kontrolle wurde ungespaltenes Trx/His₆-AlsR auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 15, Spur 3). Es ist zu erkennen, dass der Tag des Trx/His₆-AlsR Proteins weder nach 6 h (Abb. 15, Spur 4), 16 h (Abb. 15, Spur 5), 24 h (Abb. 15, Spur 6) noch 48 h (Abb. 15, Spur 7) durch die Enterokinase abgespalten wurde. Auch die Inkubation mit größeren Mengen Enterokinase (100 U und 200 U Enterokinase pro mg Trx/His₆-AlsR) führte nach 16stündiger Inkubation nicht zu einer Spaltung von Trx/His₆-AlsR (Daten nicht gezeigt).

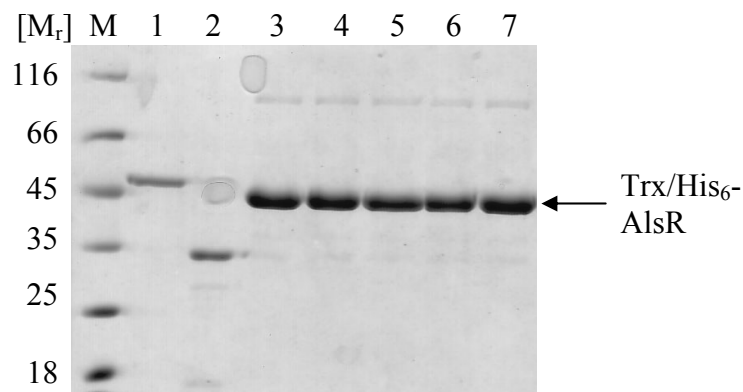


Abb. 15 SDS-PAGE Analyse der Enterokinase-Spaltung von Trx/His₆-AlsR. Dargestellt ist ein Kontrollprotein mit einer Größe von 48 kDa (Spur 1), das durch die Enterokinase gespaltenes Kontrollprotein (Spur 2), ungespaltenes Trx/His₆-AlsR (Spur 3), sowie Trx/His₆-AlsR, das für 6 h (Spur 4), 16 h (Spur 5), 24 h (Spur 6) und 48 h (Spur 7) mit 50 U Enterokinase inkubiert wurde. Trx/His₆-AlsR wird nicht von der Enterokinase gespalten. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Eine Möglichkeit dafür, dass der Tag von Trx/His₆-AlsR von der Enterokinase nicht abgespalten wurde, könnte in der Faltung des Fusionsproteins begründet liegen. Es könnte sein, dass Trx/His₆-AlsR so gefaltet vorlag, dass sich die spezifische Schnittstelle für die Enterokinase an einer unzugänglichen Stelle befand.

Obwohl AlsR mit dem Expressionsplasmid pET32a-AlsR löslich in Form von Trx/His₆-AlsR produziert werden konnte, war es nicht geeignet für weitere Untersuchungen. Der Tag des Fusionsproteins konnte nicht abgespalten werden, und das Fusionsprotein war nicht in der Lage, an ein *alsSD* Promotorfragment zu binden. Daher war der nächste Schritt, lösliches AlsR zu produzieren, bei welchem der Tag abgespalten werden konnte.

4.1.3 Produktion und Reinigung von Trx/Strep-AlsR

In einem neuen Expressionssystem sollte AlsR als Fusionsprotein mit einem *Strep*-Tag II (im Folgenden *Strep*-Tag genannt) gereinigt werden. Hierfür wurde das Expressionsplasmid pET52b ausgewählt, bei welchem die Expression des *alsR* Gens über einen induzierbaren T7-Promotor reguliert wird. AlsR wird hierbei als *Strep*-AlsR Fusionsprotein produziert, wobei der N-terminale *Strep*-Tag durch spezifische Wechselwirkungen mit *Strep*-Tactin[®] eine Reinigung des Fusionsproteins ermöglicht. *Strep*-Tactin[®] ist eine modifizierte Form von Streptavidin und ist kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden. So wird eine effiziente Einstufen-Reinigung des *Strep*-AlsR Proteins aus der Cytoplasmafraktion der produzierenden *E. coli* BL21 Codon Plus[™] (DE3)-RIL Zellen ermöglicht. Zwischen dem *Strep*-Tag und AlsR befindet sich eine Schnittstelle für die HRV-3C Protease. Diese Protease spaltet an der spezifischen Erkennungssequenz LeuGluValLeuPheGlnGlyPro zwischen Gln und Gly. So verbleiben nach der Abspaltung des Tags die drei zusätzlichen Aminosäurereste Gly, Pro und Gly am N-Terminus von AlsR.

Durch die Produktion von Trx/His₆-AlsR ist bekannt, dass die Produktion von AlsR als Fusion mit einem Trx-Tag zu einer verbesserten Löslichkeit des Proteins führt (Kap. 4.1.1). Daher wurde das Plasmid pET52bTrx als modifizierte Version von pET52b konstruiert. Hierfür wurde das *trxA* Gen aus *E. coli* in das Plasmid pET52b kloniert und anschließend das *alsR* Gen aus *B. subtilis* mit pET52bTrx zu pET52bTrx-AlsR fusioniert. Der Trx-Tag von so produziertem Trx/*Strep*-AlsR befindet sich N-terminal vom *Strep*-Tag und wird dementsprechend bei dessen Abspaltung durch die HRV-3C Protease ebenfalls eliminiert. Die Größe des gesamten Tags beläuft sich auf ca. 13 kDa. AlsR aus *B. subtilis* hat eine Größe von ca. 34,3 kDa, so dass das Trx/*Strep*-AlsR Fusionsprotein eine Größe von etwa 47 kDa besitzt. Die graphische Karte des Expressionsplasmids pET52bTrx-AlsR ist in Abb. 16 dargestellt.

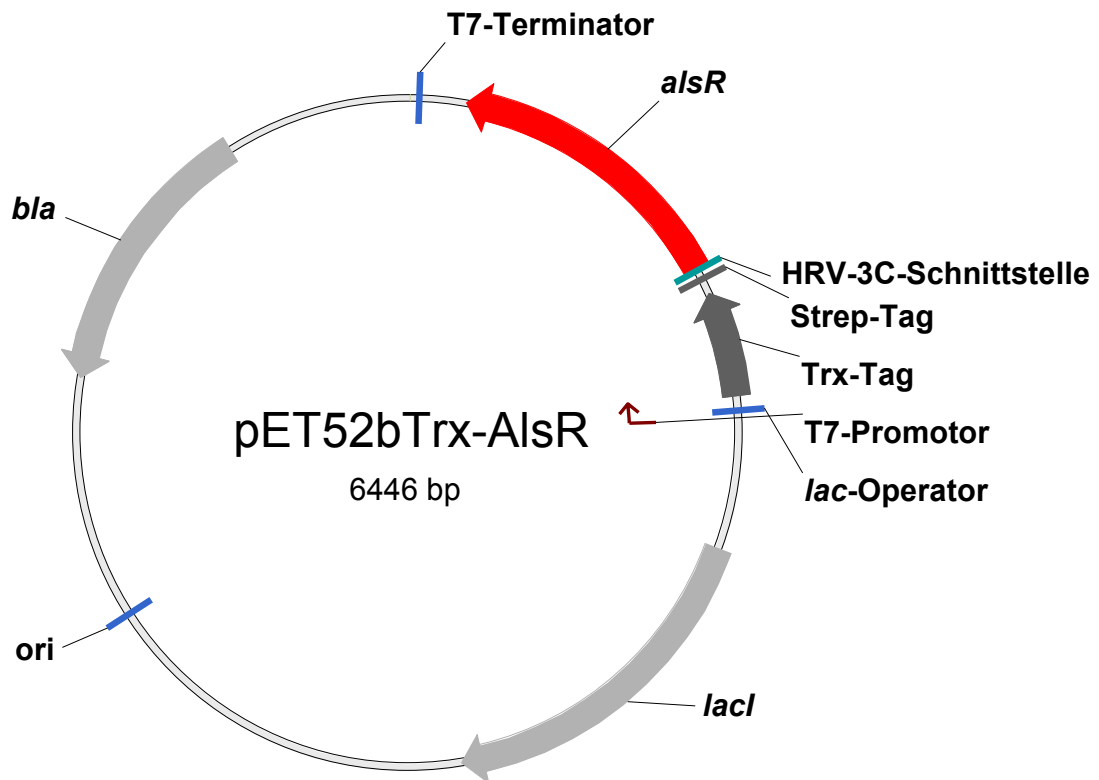


Abb. 16 Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pET52bTrx-AlsR zur Produktion von Trx/Strep-AlsR (vereinfacht dargestellt). Der T7-Promotor wird durch einen Pfeil angezeigt. lac-Operator, T7-Terminator und „origin of replication“ (ori) sind als blaue Balken dargestellt. Der Trx-Tag ist als dunkelgrauer Pfeil, der Strep-Tag als dunkelgrauer Balken und die HRV-3C-Schnittstelle als grüner Balken dargestellt. Das alsR Gen ist als roter Pfeil, die Gene für Ampicillin-Resistenz (*bla*) und Lac-Repressor (*lacI*) sind als hellgraue Pfeile dargestellt. Die Richtung der Pfeile gibt die Orientierung der entsprechenden Gene im Plasmid an.

Um festzustellen, ob Trx/Strep-AlsR in löslicher Form produziert werden kann, wurden Produktionstests durchgeführt. Hierfür wurden *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR transformiert. Die Proteinproduktion wurde bei einer OD₅₇₈ von 1,0 durch Zugabe von 300 µM IPTG gestartet und die Zellen bei 37 °C, 25 °C und 17 °C und jeweils 180 rpm inkubiert. Die beste Ausbeute an löslichem Trx/Strep-AlsR wurde bei 25 °C erhalten, was in Abb. 17 zu sehen ist. Bereits eine Stunde nach Induktion der Proteinproduktion war in der unlöslichen Fraktion eine induzierte Bande mit einer Größe von ca. 45 kDa erkennbar (Abb. 17, Spur 2). Diese Bande repräsentierte wahrscheinlich Trx/Strep-AlsR. Die Stärke der Trx/Strep-AlsR Bande in der unlöslichen Fraktion blieb über einen Produktionszeitraum von 16 Stunden stabil (Abb. 17, Spur 2-5). In der löslichen Fraktion war nach Induktion der Proteinproduktion zu allen Zeitpunkten lediglich eine schwach induzierte entsprechende Bande erkennbar, deren Stärke zu allen Zeitpunkten vergleichbar war (Abb. 17, Spur 7-10). Nach 16stündiger Proteinproduktion war die Zelldichte jedoch um den Faktor 2,5 höher als nach vierstündiger

Proteinproduktion, was in einer insgesamt höheren Ausbeute an Trx/*Strep*-AlsR resultierte. Daher wurde für die folgende Reinigung von Trx/*Strep*-AlsR eine 16stündige Produktion bei 25 °C und 180 rpm gewählt.

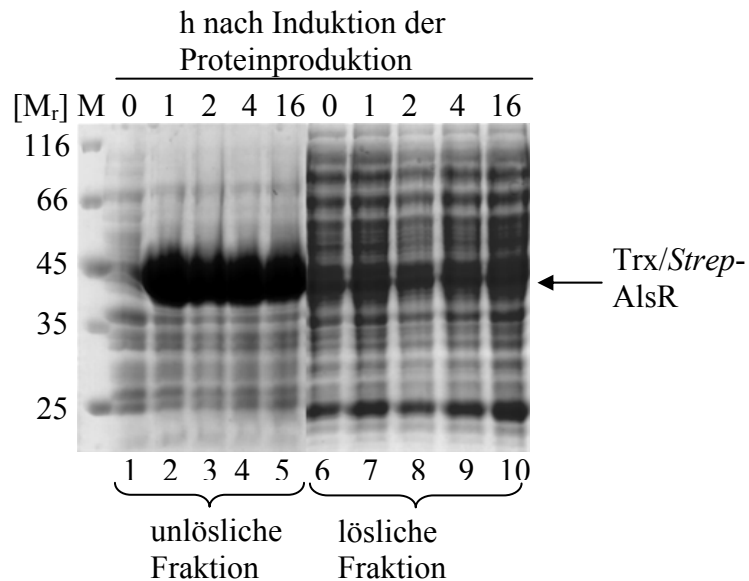


Abb. 17 SDS-PAGE Analyse der Testproduktion von Trx/*Strep*-AlsR bei 25 °C. Dargestellt sind die Proteingemische der unlöslichen Fraktion (Spur 1-5), sowie der cytoplasmatischen, löslichen Fraktion (Spur 6-10) lysierter *E. coli* Zellen (entsprechend einer OD₅₇₈ von 0,5) zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinproduktion (Spur 1 und 6), sowie 1 Stunde (Spur 2 und 7), 2 Stunden (Spur 3 und 8), 4 Stunden (Spur 4 und 9) und 16 Stunden (Spur 5 und 10) nach Induktion der Proteinproduktion mit 300 µM IPTG. Der Großteil des ca. 45 kDa großen Trx/*Strep*-AlsR Fusionsproteins befindet sich in der unlöslichen Fraktion, lediglich ein geringer Teil befindet sich in der löslichen Fraktion. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Zur Produktion von Trx/*Strep*-AlsR wurden 3 Liter LB-Medium mit einer Vorkultur *E. coli* BL21 Codon Plus™ (DE3)-RIL Zellen, die zuvor mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR transformiert wurden, inokuliert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 1,0 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 300 µM IPTG gestartet. Die Proteinproduktion erfolgte bei 25 °C und 180 rpm für eine Dauer von 16 Stunden. Das Fusionsprotein wurde über eine *Strep*-Tactin®-Tropfsäule (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 3 ml gereinigt. Produktion und Reinigung von Trx/*Strep*-AlsR wurden per SDS-PAGE verfolgt (Abb. 18). Nach 16stündiger Produktion bei 25 °C war im SDS-Gel eine distinkte Trx/*Strep*-AlsR Bande mit einer Größe von ca. 45 kDa erkennbar (Abb. 18, Spur 1). Nach Zellaufschluss und Sedimentation der unlöslichen Fraktion war in der löslichen Fraktion Trx/*Strep*-AlsR vorhanden (Abb, Spur 2). Auch im Durchfluss dieser löslichen Fraktion nach Passage der *Strep*-Tactin®-Säule sowie in der Waschfraktion befand sich Trx/*Strep*-AlsR (Abb. 18, Spur 3 und 4). Trx/*Strep*-AlsR wurde mit

2,5 mM Desthiobiotin in Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Das 45 kDa große Protein stellte neben leichten Verunreinigungen mit ca. 90 % die Hauptbande im SDS-Gel dar und war in allen Elutionsfraktionen in einer ähnlichen Menge vorhanden (Abb. 18, Spur 5-10).

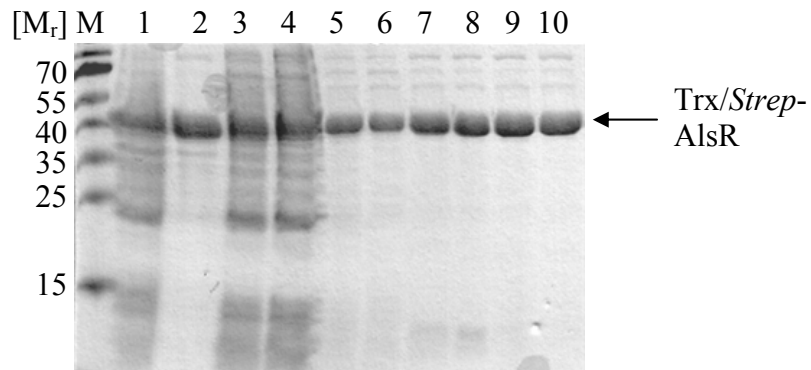


Abb. 18 SDS-PAGE Analyse der Produktion und Reinigung von rekombinantem Trx/*Strep*-AlsR. Dargestellt ist das Proteingemisch der löslichen und unlöslichen Fraktion lysierter *E. coli* Zellen (entsprechend einer OD_{578} von 0,5) nach 16stündiger Proteinproduktion bei 25 °C (Spur 1), das Proteingemisch der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss und Sedimentation der unlöslichen Fraktion (Spur 2), der Durchfluss der löslichen Fraktion nach Passage der *Strep*-Tactin[®]-Matrix (Spur 3), eine Waschfraktion (Spur 4) sowie sechs Elutionsfraktionen (Spur 5-10). Die Reinigung erfolgte über eine *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule mit 3 ml Säulenvolumen. Das Volumen der *E. coli* Kultur betrug 3 Liter. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Das Vorhandensein von Trx/*Strep*-AlsR im Durchfluss (Abb. 18, Spur 3) sowie in der Waschfraktion (Abb. 18, Spur 4) ist nicht durch ein Überladen der *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule erklärbar, da eine Erhöhung des Säulenvolumens um bis zu 200 % zu einem vergleichbaren Ergebnis führte (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung für das Vorhandensein von Trx/*Strep*-AlsR im Durchfluss und in der Waschfraktion könnte sein, dass das Fusionsprotein nicht einheitlich korrekt gefaltet war. Dadurch wäre es möglich, dass die Bindung des *Strep*-Tags an die *Strep*-Tactin[®]-Matrix nicht optimal erfolgen konnte. Auch die Tatsache, dass Trx/*Strep*-AlsR in vergleichbaren Mengen in sämtlichen Elutionsfraktionen vorhanden war (Abb. 18, Spur 5-10) ist unüblich. Im Normalfall befindet sich der Großteil eines eluierten Proteins in lediglich ein bis zwei Elutionsfraktionen zu jeweils einem Milliliter (vgl. Abb. 13). Auch diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass das Fusionsprotein nicht einheitlich korrekt gefaltet war. Insgesamt können jedoch aus 3 Liter *E. coli* BL21 Codon Plus[™] (DE3)-RIL Zellen, die mit dem Plasmid pET52bTrx-AlsR transformiert wurden, durchschnittlich 1-2 mg Trx/*Strep*-AlsR gereinigt werden.

4.1.4 Untersuchung der DNA-Bindungs-fähigkeit von Trx/Strep-AlsR mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)

Um zu bestimmen, ob das produzierte und gereinigte Trx/Strep-AlsR an den Promotor des *alsSD* Operons binden kann, wurden erneut Gelretardationsanalysen durchgeführt.

Für die Gelretardationsanalysen wurde hier ein DNA-Fragment gewählt, welches den *alsSD* Promotor von Position -89 bis -48 repräsentiert. Dieses 42 bp lange DNA-Fragment wurde durch Annealing der zwei komplementären, synthetischen Oligonukleotide EH219 und EH220 (Tab. 8) erhalten. Durch Verwendung von Oligonukleotiden konnte die Menge an DNA für die Gelretardationsanalysen im Vergleich zu per PCR amplifizierter DNA genauer definiert werden. Das DNA-Fragment wurde radioaktiv markiert und mit steigenden Mengen Trx/Strep-AlsR inkubiert (Abb. 19). Die radioaktiv markierte DNA wurde ohne Trx/Strep-AlsR (Abb. 19, Spur 1), sowie mit 0,725 pmol (Abb. 19, Spur 2), 1,45 pmol (Abb. 19, Spur 3) und 2,9 pmol Trx/Strep-AlsR inkubiert. Es war bei keiner eingesetzten Menge an Trx/Strep-AlsR eine retardierte Bande erkennbar. Dies bedeutet, dass Trx/Strep-AlsR nicht an das 42 bp lange *alsSD* Promotorfragment gebunden hat (Abb. 19).

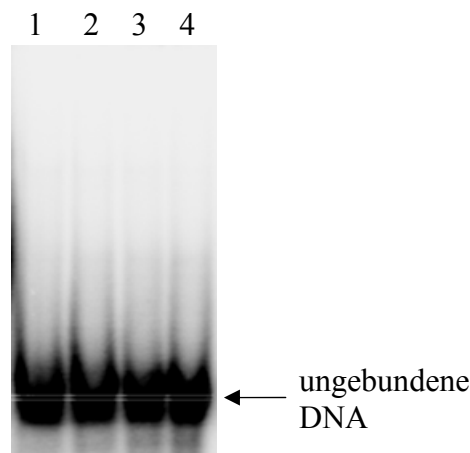


Abb. 19 Gelretardationsanalyse eines *alsSD* Promotorfragments mit steigenden Mengen Trx/Strep-AlsR. Dargestellt ist ein 42 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors repräsentiert. Trx/Strep-AlsR wurde in steigenden Mengen zu jeweils 0,1 pmol DNA gegeben. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von Trx/Strep-AlsR durchgeführt (Spur 1). Trx/Strep-AlsR wurde in folgenden Mengen zu den Ansätzen gegeben: Spur 2: 0,725 pmol, Spur 3: 1,45 pmol, Spur 4: 2,9 pmol. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet, auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaserscanner visualisiert. Trx/Strep-AlsR bindet nicht an das *alsSD* Promotorfragment.

Eine Erklärung dafür, dass Trx/*Strep*-AlsR nicht an das *alsSD* Promotorfragment gebunden hat, liefert, wie schon für Trx/His₆-AlsR zuvor beschrieben (Kap. 4.1.2), die Lokalisation und Größe des Tags. Da der 13 kDa große Trx/*Strep*-Tag N-terminal unmittelbar vor der DNA-Bindedomäne von AlsR lokalisiert ist, könnte er die Bindung des Proteins an den *alsSD* Promotor beeinflussen. Aufgründessen sollte der Tag von Trx/*Strep*-AlsR mit der HRV-3C Protease (im Folgenden als HRV-3C bezeichnet) abgespalten werden.

Die HRV-3C spaltet an der Aminosäuresequenz LeuGluValLeuPheGlnGlyPro, welche sich zwischen dem Trx/*Strep*-Tag und AlsR befindet, spezifisch zwischen den Aminosäuren Gln und Gly. Gespaltenes AlsR besitzt dann lediglich noch die drei zusätzlichen Aminosäurereste Gly, Pro und Gly am N-Terminus. Die Spaltung von Trx/*Strep*-AlsR erfolgte bei 4 °C über einen Zeitraum von 16 Stunden mit verschiedenen Mengen HRV-3C. Als Kontrolle wurde Trx/*Strep*-AlsR ohne HRV-3C inkubiert und der Erfolg der Spaltung per SDS-PAGE kontrolliert. Der Einsatz von 200 U HRV-3C pro mg Trx/*Strep*-AlsR führte zu einer Abspaltung des Tags bei ca. 70 % des eingesetzten Proteins verglichen mit ungespaltenem Protein (Abb. 20, Spur 1 und 2). AlsR ohne Tag besaß eine Größe von ca. 33 kDa (Abb. 20, Spur 2), was gut mit der kalkulierten molekularen Masse von 34,3 kDa übereinstimmte. Zusätzlich war im SDS-Gel die HRV-3C mit einer Größe von ca. 22 kDa als Bande erkennbar (Abb. 20, Spur 2). Wurde die Menge auf 20 U HRV-3C pro mg Trx/*Strep*-AlsR reduziert, wurden nur noch ca. 10 % des Proteins gespalten (Abb. 20, Spur 3). Eine weitere Reduktion der HRV-3C Menge auf 2 U pro mg Trx/*Strep*-AlsR resultierte in keiner Spaltung von Trx/*Strep*-AlsR mehr (Abb. 20, Spur 4).

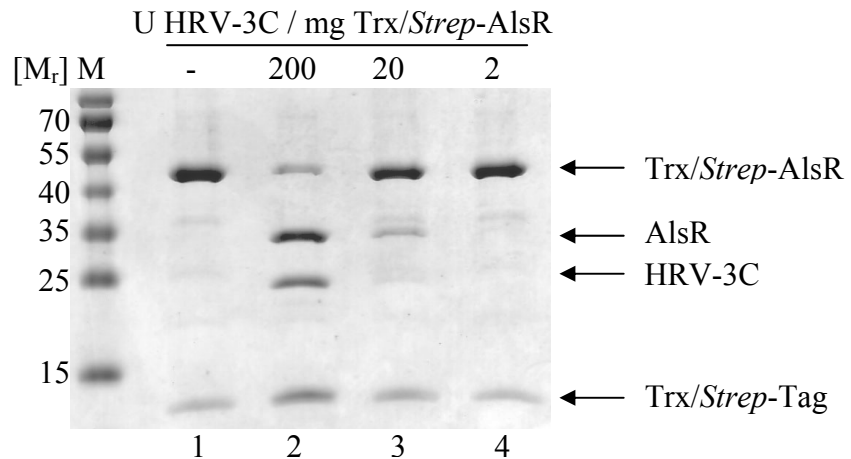


Abb. 20 SDS-PAGE Analyse der HRV-3C-Spaltung von Trx/Strep-AlsR. Dargestellt ist ungespaltenes Trx/Strep-AlsR mit einer Größe von ca. 45 kDa (Spur 1), sowie Trx/Strep-AlsR, das mit 200 U (Spur 2), 20 U (Spur 3) und 2 U HRV-3C pro mg Trx/Strep-AlsR-Protein (Spur 4) bei 4 °C für 16 h inkubiert wurde. Die Inkubation mit 200 U HRV-3C pro mg Trx/Strep-AlsR führte zu einer Abspaltung des Tags bei ca. 70 % des eingesetzten Trx/Strep-AlsR. Die HRV-3C ist in Spur 2 mit einer Größe von ca. 22 kDa erkennbar. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Die Abspaltung des Tags von Trx/Strep-AlsR durch die HRV-3C war nicht vollständig, sondern erfolgte lediglich bei ca. 70 % des eingesetzten Proteins (Abb. 20, Spur 2). Auch die Inkubation mit einer größeren Menge HRV-3C (bis zu 400 U/mg Trx/Strep-AlsR) oder die Verlängerung der Inkubationszeit von Trx/Strep-AlsR mit der HRV-3C (auf bis zu 48 h) führte zu keiner verstärkten Abspaltung des Tags (Daten nicht gezeigt). Dies könnte erneut dadurch erklärt werden, dass das Fusionsprotein eventuell nicht einheitlich korrekt gefaltet ist und die HRV-3C nicht in jedem Fall Zugang zu ihrer spezifischen Schnittstelle hat. So waren die besten, wenn auch suboptimalen, Parameter für die Abspaltung des Tags von Trx/Strep-AlsR die Inkubation mit 200 U HRV-3C pro mg Protein für 16 h bei 4 °C.

Da die HRV-3C mit einem His-Tag fusioniert ist, ist ihre Abtrennung aus einer Proteinlösung über eine Affinitäts-Chromatographie möglich. Dazu wurde die Proteinlösung über eine Ni²⁺-IDA-Tropfsäule mit einem Säulenvolumen von 500 µl gegeben. An diese Matrix band die HRV-3C, während AlsR, der Trx/Strep-Tag und nicht-gespaltenes Trx/Strep-AlsR die Säule ungehindert passieren konnten und im Durchfluss zu finden waren.

Um den abgespaltenen Trx/Strep-Tag sowie ungespaltenes Trx/Strep-AlsR von gespaltenem AlsR zu trennen, wurde die Proteinlösung zunächst zur Entfernung des Desthiobiotins bei 4 °C gegen Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM

NaCl, 10 % (v/v) Glyzerin) dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung über eine *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule mit einem Säulenvolumen von 500 µl gegeben. Ungespaltenes Trx/*Strep*-AlsR sowie der abgespaltene Tag sollten an diese Säule binden, so dass sich schließlich nur noch AlsR ohne Tag im Durchfluss befinden sollte.

Das auf diese Weise gereinigte AlsR aus *B. subtilis* ist in Abb. 21 zu sehen. Auf dem SDS-Gel ist keine der HRV-3C entsprechenden Bande bei einer Größe von 22 kDa vorhanden (Abb. 21, Spur 2). Dies bedeutet, dass die Entfernung der His-getaggen HRV-3C Protease über eine Ni²⁺-IDA-Tropfsäule erfolgreich verlief. Trotz einer erneuten Passage über eine *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule erfolgte keine Entfernung des ungespaltenen Trx/*Strep*-AlsR sowie des abgespaltenen Tags aus der Proteinlösung (Abb. 21, Spur 2).

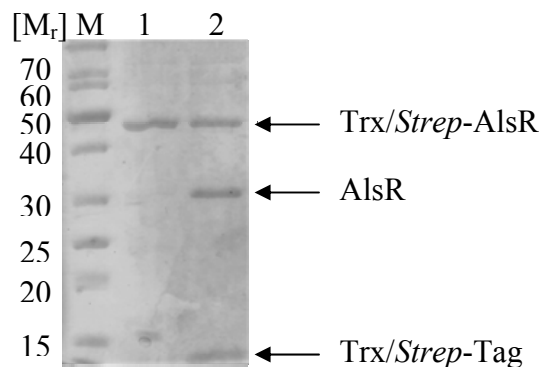


Abb. 21 Gereinigtes *Bacillus subtilis* AlsR. Dargestellt ist das ungespaltene Trx/*Strep*-AlsR nach der Reinigung über eine *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule (Spur 1) und Trx/*Strep*-AlsR nach der Spaltung mit 200 U HRV-3C/mg Protein, Abtrennung der HRV-3C über eine Ni²⁺-IDA-Tropfsäule, 90-minütiger Dialyse gegen Waschpuffer bei 4 °C sowie Abtrennung des ungespaltenen Proteins und des abgespaltenen Tags über eine weitere *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule (Spur 2). Es ist erkennbar, dass die HRV-3C (Größe 22 kDa) durch die Ni²⁺-IDA-Tropfsäule aus der Proteinlösung eliminiert werden konnte. Ungespaltenes Trx/*Strep*-AlsR sowie der abgespaltene Tag sind jedoch in der Proteinlösung trotz Passage über eine weitere *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule verblieben. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Die Tatsache, dass trotz erneuter Passage über eine *Strep*-Tactin[®]-Tropfsäule keine Entfernung des ungespaltenen Trx/*Strep*-AlsR sowie des abgespaltenen Trx/*Strep*-Tags erfolgte, könnte erneut dadurch erklärt werden, dass das Fusionsprotein nicht einheitlich korrekt gefaltet ist. Dadurch wäre es möglich, dass die Bindung vom *Strep*-Tag des ungespaltenen Trx/*Strep*-AlsR sowie des abgespaltenen Trx/*Strep*-Tags an die *Strep*-Tactin[®]-Matrix nicht optimal erfolgen konnte.

4.1.5 Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von AlsR ohne Tag mittels Gelretardationsanalysen (EMSA)

Um zu bestimmen, ob AlsR ohne Tag die Fähigkeit zur Bindung an den *alsSD* Promotor besitzt, wurden erneut Gelretardationsanalysen durchgeführt.

Hierfür wurde das bereits in Kap. 4.1.4 beschriebene, radioaktiv markierte DNA-Fragment verwendet, das Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors entspricht. Die Inkubation des DNA-Fragments erfolgte mit steigenden Mengen gereinigtem AlsR, wie es in Abb. 21 zu sehen ist. Als Kontrolle wurde das DNA-Fragment ohne Zugabe von AlsR inkubiert (Abb. 22, Spur 1). Die Zugabe von 0,029 pmol bzw. 0,087 pmol AlsR führte zu keiner sichtbaren Bildung einer retardierten Bande im Acrylamidgel (Abb. 22, Spur 2 und 3). Die Zugabe von 0,29 pmol führte jedoch zur Bildung einer schwach sichtbaren retardierten Bande, die einen DNA-Protein-Komplex repräsentiert. Dieser wird als Shift 1 bezeichnet (Abb. 22, Spur 4). Die Erhöhung der AlsR-Menge auf 0,87 pmol bzw. 2,9 pmol AlsR verstärkte die Menge dieses DNA-Protein-Komplexes (Abb. 22, Spur 5 und 6). Zusätzlich tauchte im Acrylamidgel eine weitere retardierte Bande auf, die einen zweiten DNA-Protein-Komplex repräsentiert. Dieser wird als Shift 2 bezeichnet (Abb. 22, Spur 5 und 6). Die Menge beider DNA-Protein-Komplexe konnte durch Erhöhung der AlsR-Menge im Reaktionsansatz nicht gesteigert werden (Abb. 22, Spur 7-9). Sowohl die Zugabe von 8,7 pmol als auch von 29 pmol AlsR resultierte dabei in DNA-Protein-Komplexen, deren Stärke mit der nach Zugabe von 2,9 pmol AlsR vergleichbar war (Abb. 22, Spur 7 und 8). Im Vergleich dazu führte die Zugabe von 87 pmol AlsR sogar zur Bildung von schwächer ausgeprägten DNA-Protein-Komplexen (Abb. 22, Spur 9). In diesem Fall erschienen die retardierten Banden zusätzlich undefinierter und diffuser als in den Ansätzen mit weniger Proteinmenge. Ein möglicher Grund hierfür könnten Aggregationen des Proteins sein.

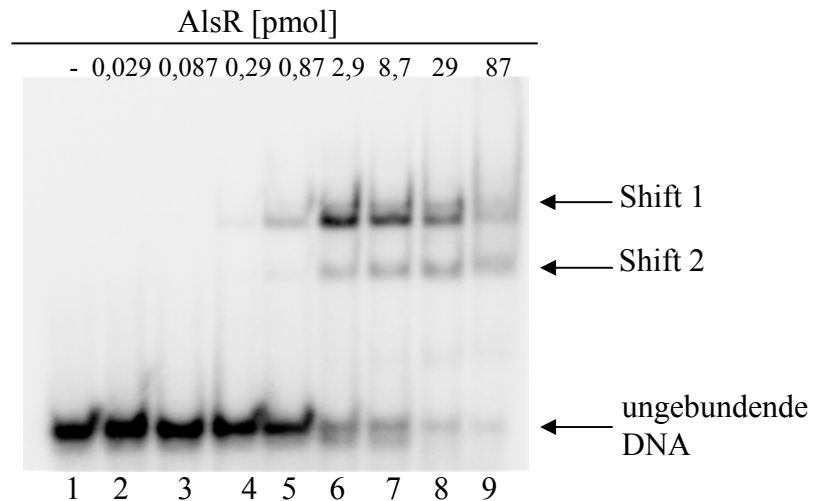


Abb. 22 Gelretardationsanalyse eines *alsSD* Promotorfragments mit steigenden Mengen gereinigtem *Bacillus subtilis* AlsR. Dargestellt ist ein 42 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors repräsentiert. AlsR wurde in steigenden Mengen zu jeweils 0,1 pmol DNA gegeben. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). AlsR wurde in folgenden Mengen zu den Ansätzen gegeben: Spur 2: 0,029 pmol, Spur 3: 0,087 pmol, Spur 4: 0,29 pmol, Spur 5: 0,87 pmol, Spur 6: 2,9 pmol, Spur 7: 8,7 pmol, Spur 8: 29 pmol, Spur 9: 87 pmol. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde getrocknet, 12 h auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaserscanner visualisiert. AlsR bindet ab einer Menge von 0,87 pmol an 0,1 pmol markiertes DNA-Fragment. Durch Zugabe von 2,9 pmol AlsR wird eine größere Menge DNA gebunden. Diese kann durch Zugabe von höheren Mengen AlsR jedoch nicht mehr gesteigert werden.

War zuvor nach Zugabe von 2,9 pmol Trx/*Strep*-AlsR keine retardierte Bande im Acrylamidgel sichtbar (Abb. 19), konnte nun bereits ab einer Zugabe von 0,29 pmol AlsR ohne Tag eine retardierte Bande detektiert werden (Abb. 22). Dies bedeutet, dass zuvor der Tag die Bindung von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment gestört hat.

Für LTTRs wurde beschrieben, dass sie bereits ohne Anwesenheit ihres Effektors an ihre Erkennungssequenz („*recognition binding site*“, RBS) binden. Dies konnte hier auch für AlsR bestätigt werden. Bei der Bindung von AlsR an das 42 bp lange *alsSD* Promotorfragment entstanden hierbei zwei DNA-Protein-Komplexe in unterschiedlicher Größe (Abb. 22). Sie wurden als Shift 1 und Shift 2 bezeichnet, wobei die Ausprägung von Shift 1 gegenüber Shift 2 deutlich stärker war. Aufgrund dieser Dominanz wurde Shift 1 als der bevorzugte DNA-Protein-Komplex betrachtet. Die Entstehung von insgesamt mehreren DNA-Protein-Komplexen kann verschiedene Gründe haben. Für LTTRs ist bekannt, dass sie meist als Tetramer oder seltener als Dimer an ihre Ziel-DNA binden (Maddocks and Oyston, 2008). Es könnte also demnach sein, dass an das 42 bp lange *alsSD* Promotorfragment mehr als ein AlsR-Molekül gebunden hat. Um dies genauer zu bestimmen, sollte durch

Gelpermeations-Chromatographie der Oligomerisierungsgrad von AlsR bestimmt werden.

4.1.6 Untersuchung des Oligomerisierungsgrads von *Bacillus subtilis* AlsR

Transkriptionsfaktoren der LysR-Familie wurden meist als Tetramere oder Dimere beschrieben (Maddocks and Oyston, 2008; Schell, 1993). Zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrads von gereinigtem AlsR, welches nach der Reinigung als eine Mischung aus AlsR ohne Tag, dem Trx/*Strep*-Tag und ungespaltenem Trx/*Strep*-AlsR vorlag, wurde eine analytische Gelpermeations-Chromatographie (GPC) durchgeführt. Dazu wurden nacheinander gereinigtes AlsR und die Eichproteine Albumin, Carboanhydrase und Lysozym auf eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) aufgetragen und anhand ihrer Größe getrennt. Durch die drei Eichproteine wurde eine Eichkurve erstellt (Abb. 23), mit deren Hilfe die molekulare Masse von gereinigtem AlsR bestimmt werden sollte.

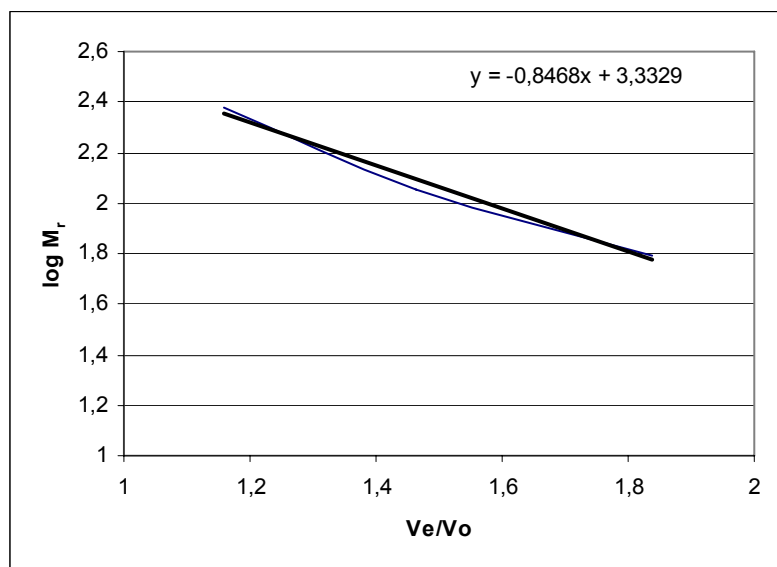


Abb. 23 Eichkurve zur Bestimmung des Molekulargewichts von gereinigtem AlsR. Dargestellt ist eine Eichgerade der drei Proteine Albumin (M_r 66.000), Carboanhydrase (M_r 29.000) und Lysozym (M_r 14.000). Der Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts ($\log M_r$) wurde gegen den Quotienten aus dem Elutionsvolumen (V_e) des jeweiligen Proteins [ml] und dem Totvolumen (V_0) der Säule [ml] aufgetragen. Das Totvolumen der Säule betrug 8 ml. Die erhaltene Eichkurve (dünne, blaue Linie) wurde mittels einer Regression normalisiert (dicke, schwarze Linie). Die zugehörige Regressionsgleichung ist oben rechts im Diagramm angegeben.

Das Elutionsdiagramm von gereinigtem AlsR zeigte vier Peaks mit molekularen Massen von ca. 717.300 (Abb. 24, Peak 1), 69.100 (Abb. 24, Peak 2), 33.200 (Abb. 24, Peak 3) sowie 15.900 (Abb. 24, Peak 4).

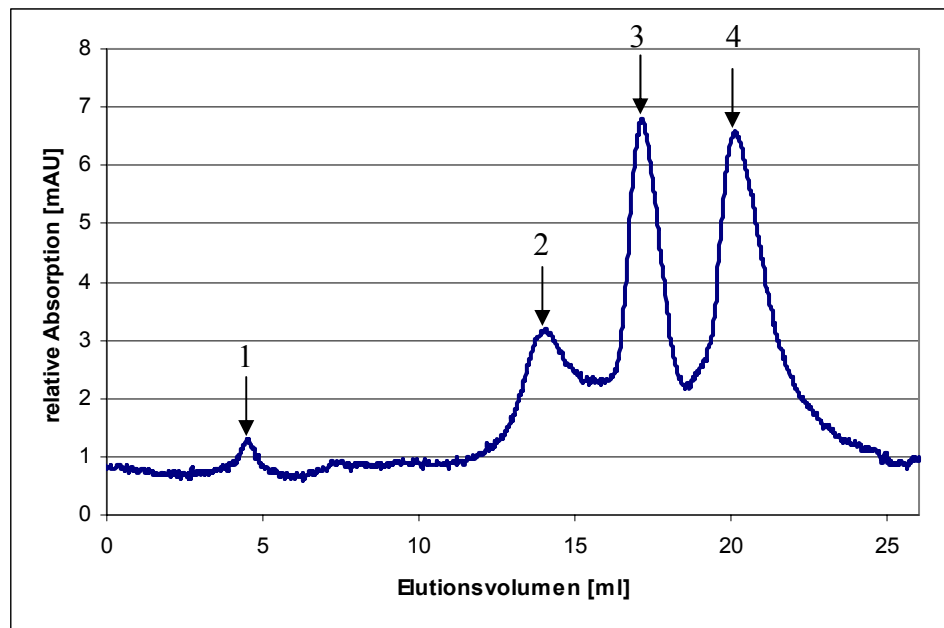


Abb. 24 Elutionsdiagramm von AlsR nach erfolgreicher Gelpermeations-Chromatographie. Dargestellt ist gereinigtes AlsR nach einer Passage über eine Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Das Elutionsdiagramm zeigt vier definierte Peaks, die durch Pfeile mit der Nummerierung 1 bis 4 gekennzeichnet sind. Peak 1 eluierte bei einem Volumen von 4,51 ml, Peak 2 bei 14,11 ml, Peak 3 bei 17,12 ml und Peak 4 bei 20,14 ml.

Mit einer Größe von ca. 717,3 kDa könnte Peak 1 aggregiertes Protein repräsentieren. Bei Peak 2 besteht mit einer Größe von ca. 69,1 kDa die Möglichkeit, dass es sich um eine dimere Form von AlsR handelt, welche mit der kalkulierten Größe von 68,6 kDa sehr gut übereinstimmt. Peak 3 repräsentiert mit einer Größe von etwa 33,2 kDa sehr wahrscheinlich das AlsR Monomer ohne Tag. Die Größe stimmt mit der kalkulierten Größe von 34,3 kDa gut überein. Peak 4 hat eine ungefähre Größe von 15,9 kDa und könnte damit den abgespaltenen Tag von AlsR repräsentieren, der eine ungefähre Größe von etwa 13 kDa besitzt. Bemerkenswerterweise findet sich im Elutionsdiagramm kein Peak in der Größe von Trx/Strep-AlsR, welches sich noch in der Proteinlösung befand (vgl. Abb. 21). Ein entsprechender Peak müsste mit einem Elutionsvolumen von etwa 15,85 ml (entsprechend einer Größe von ca. 45 kDa) zwischen den Peaks 2 und 3 lokalisiert sein. Es wäre möglich, dass Trx/Strep-AlsR in aggregierter Form vorliegt und demnach Peak 1 repräsentiert. Dies würde auch erklären, warum sich bei der Reinigung von Trx/Strep-AlsR stets Protein im Durchfluss und in der Waschfraktion befand. Zusätzlich könnte hierdurch erklärt werden, weshalb die Abspaltung des Tags durch die HRV-3C nicht vollständig erfolgte und außerdem bei der daran anschließenden Passage über eine *Strep-Tactin*[®]-Matrix ungespaltenes Protein in den Durchfluss gelangte.

Die Peaks 2 und 3 im Elutionsdiagramm (Abb. 24), die in ihrer Größe einem AlsR-Dimer und einem AlsR-Monomer entsprachen, könnten die Entstehung der zwei DNA-Protein-Komplexe Shift 1 und Shift 2 bei der Gelretardationsanalyse von gereinigtem AlsR mit dem *alsSD* Promotorfragment erklären (Abb. 22). Shift 1 könnte demnach durch Bindung von AlsR in dimerer Form an das *alsSD* Promotorfragment entstanden sein, während Shift 2 durch die Bindung eines AlsR-Monomers entstanden sein könnte.

Da es nun möglich ist, AlsR in einer Form zu reinigen, in der das Protein an ein *alsSD* Promotorfragment bindet, sollte im nächsten Schritt die Sequenz der AlsR-Bindestelle im Promotor des *alsSD* Operons bestimmt werden.

4.2 Definition der AlsR-Bindestelle im Promotor des *alsSD* Operons

4.2.1 DNaseI-Protektionsanalysen zur Definition der AlsR-Bindestelle im Promotor des *alsSD* Operons

Durch funktionelle Analysen von *alsS-lacZ* Reportergenfusionen, bei denen der Promotor schrittweise verkürzt worden war, konnte der potentielle Bindebereich von AlsR auf die ersten 86 bp in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons eingegrenzt werden (March, 2005). Um die AlsR-Bindestelle innerhalb dieser Sequenz zu identifizieren, wurden DNaseI-Protektionsanalysen durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein dsDNA-Fragment, welches zuvor am 5'-Ende mit Digoxigenin (DIG) markiert wurde und die potentielle Bindestelle des entsprechenden transkriptionellen Regulators enthält, mit dem Enzym DNaseI fragmentiert. Die entstandenen DNA-Fragmente werden anschließend elektrophoretisch getrennt. Nach Detektion der DIG-markierten DNA-Fragmente resultiert dies in einem spezifischen Bandenmuster. Ist ein Bereich der DNA von einem Protein gebunden, so ist dieser vor der Degradation durch die DNaseI geschützt. Dieser Bereich erscheint bei der Detektion als leerer Bereich ohne Bandenmuster und wird als „Footprint“ bezeichnet.

Für die DNaseI-Protektionsanalysen wurde durch PCR-Amplifikation ein DIG-markiertes 253 bp langes DNA-Fragment hergestellt, welches den Bereich des *alsSD* Promotors von Position -200 bis Position +54 abdeckte. Die DIG-Markierung erfolgte separat sowohl am kodierenden als auch am nicht-kodierenden DNA-Strang.

Dieser Bereich beinhaltete die AlsR-Bindestelle, die sich innerhalb der ersten 86 bp des *alsSD* Promotors befindet. 35 ng des DIG-markierten DNA-Fragments wurden mit 0,725 bzw. 1,45 pmol gereinigtem AlsR inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit DNaseI fragmentiert und die Reaktionen in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. Parallel wurde mit Plasmid-DNA, die den gleichen Promotorbereich abdeckte wie das verwendete *alsSD* Promotorfragment, eine Sequenzierungsreaktion angefertigt und ebenso elektrophoretisch getrennt.

Vergleicht man beim kodierenden Strang das entstandene Fragmentmuster ohne vorherige Zugabe von AlsR mit dem nach Inkubation mit 0,725 pmol AlsR, zeigte sich ein Bereich, der deutlich weniger Fragmente enthielt (Abb. 25 A). Eine Erhöhung der AlsR-Menge auf 1,45 pmol führte zu einer weiteren Reduktion der Fragmente in diesem Bereich (Abb. 25 A). Dieser DNA-Bereich wurde also von AlsR in der DNaseI-Protektionsanalyse geschützt und enthielt die AlsR-Bindestelle. Auch im nicht-kodierenden DNA-Strang konnte nach Zugabe von 0,725 pmol oder 1,45 pmol gereinigtem AlsR ein solcher „*Footprint*“ detektiert werden (Abb. 25 B). Gereinigtes AlsR ist also in der Lage, *in vitro* sowohl an den kodierenden als auch an den nicht-kodierenden Strang eines *alsSD* Promotorfragments zu binden.

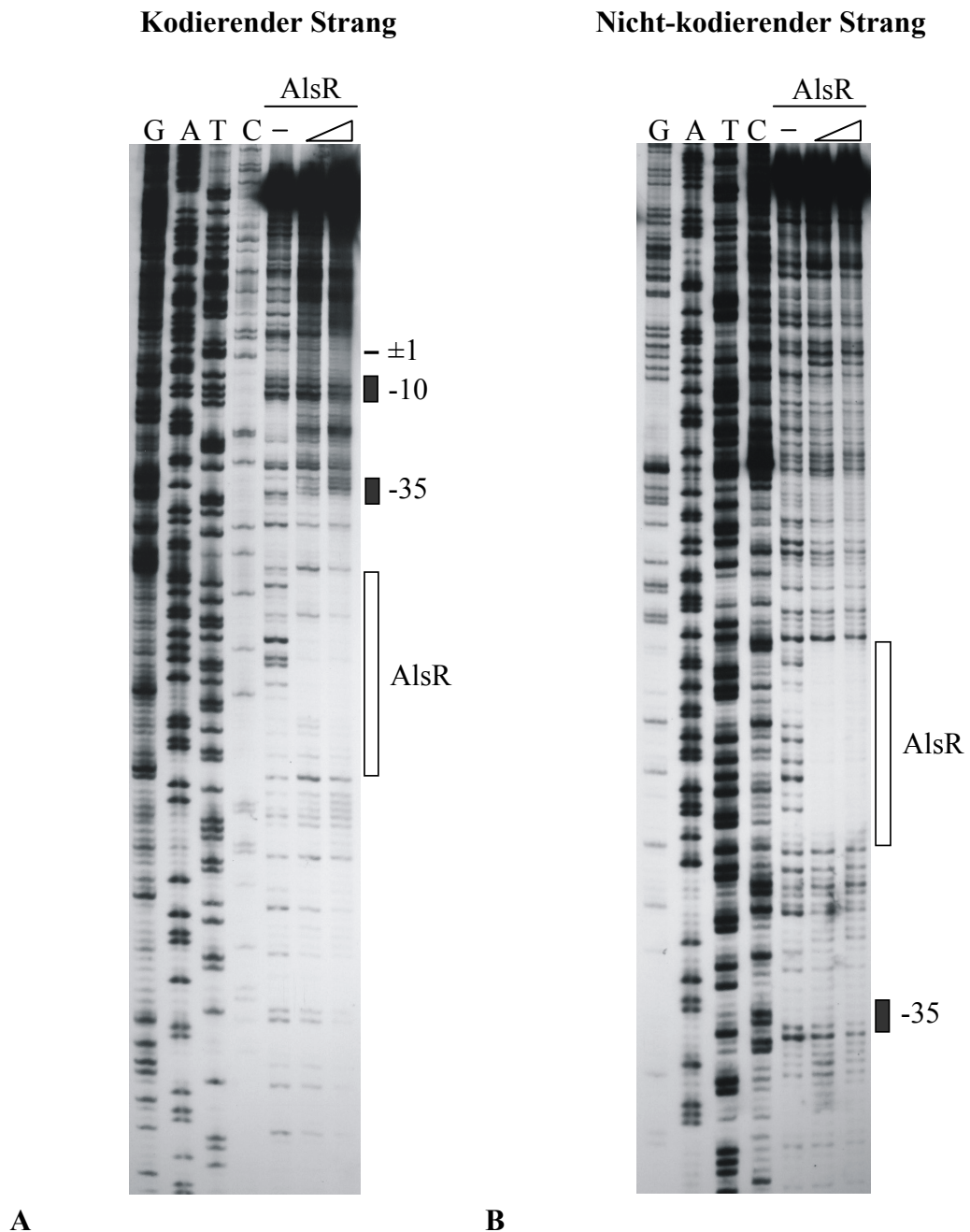


Abb. 25 DNaseI-Protektionsanalyse des kodierenden (A) und nicht-kodierenden DNA-Strangs (B) eines *alsSD* Promotorfragments mit gereinigtem *Bacillus subtilis* AlsR. Das verwendete DNA-Fragment repräsentiert Position -200 bis +54 des *alsSD* Promotors. Dargestellt sind die Sequenzierungsreaktionen (G, A, T und C) des kodierenden (A) und nicht-kodierenden (B) Strangs dieses DNA-Fragments. Die potentiellen -35 bzw. -10 Regionen des *alsSD* Promotors sind als schwarze Boxen dargestellt und entsprechend beschriftet. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch ± 1 , von AlsR protektierte DNA-Bereiche sind durch eine Box und entsprechende Beschriftung gekennzeichnet. Für die DNaseI-Protektionsanalysen wurden jeweils 35 ng DNA-Fragment ohne AlsR (-), mit 0,725 pmol und mit 1,45 pmol AlsR (steigende Mengen durch das Dreieck dargestellt) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und DNaseI-Fragmentierung wurden die Ansätze und Sequenzierungsreaktionen in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel in 1 x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt. Nach Kontaktblot und Detektion der DIG-Markierungen wurde die Membran für 40 min auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Zugabe von 0,725 pmol AlsR zum DNA-Fragment führte beim kodierenden DNA-Strang (A) zur Protektion eines definierten DNA-Abschnitts. Diese Protektion wurde durch die Zugabe von 1,45 pmol AlsR bis hin zur nahezu kompletten Protektion verstärkt. Beim nicht-kodierenden DNA-Strang (B) führte bereits die Zugabe von 0,725 pmol zur Protektion eines DNA-Abschnitts, die durch Zugabe von höheren Mengen AlsR (1,45 pmol) nicht mehr gesteigert wurde.

Die „Footprints“ in Abb. 25 zeigen deutlich, dass AlsR sowohl an den kodierenden als auch an den nicht-kodierenden DNA-Strang des verwendeten *alsSD* Promotorfragments gebunden hat. Diese Bindung erfolgte spezifisch an einen definierten Abschnitt der DNA-Sequenz, der sich um den Bereich an Position -60 herum befand. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass sich die AlsR-Bindestelle im *alsSD* Promotor innerhalb der ersten 86 bp in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt befindet (March, 2005). Die exakte Basenabfolge und Lokalisation der beiden „Footprints“ ist in Abb. 26 dargestellt.

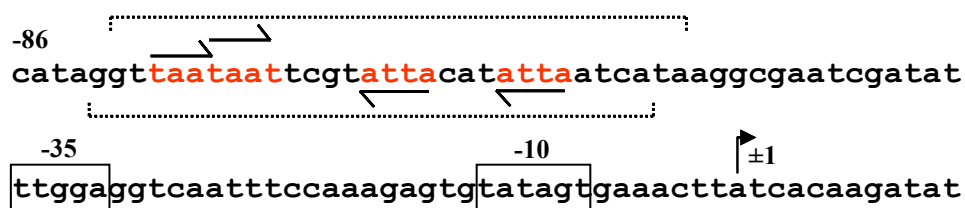


Abb. 26 Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des *alsSD* Promotors. Dargestellt ist der Promotor des *alsSD* Operons von Position -86 bis +12 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Operons. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil und die Beschriftung ± 1 markiert. Die potentiellen -35 und -10 Regionen sind durch Boxen und entsprechende Beschriftungen gekennzeichnet. Von AlsR protektierte DNA-Regionen sind als gepunktete Klammern dargestellt. Die untere Klammer zeigt den „Footprint“ des nicht-kodierenden DNA-Strangs, die obere Klammer den des kodierenden DNA-Strangs. Innerhalb dieser protektierten Region befinden sich vier potentielle palindromische Sequenzen, die durch Pfeile und rote Schrift markiert sind.

Die „Footprints“ des kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Strangs des *alsSD* Promotors überlappen (Abb. 26, gepunktete Klammern). Der „Footprint“ des kodierenden DNA-Strangs erstreckt sich über die Basenpaare -81 bis -52, der des nicht-kodierenden Strangs über die Basenpaare -82 bis -54 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons.

Innerhalb des von AlsR protektierten Bindebereichs im *alsSD* Promotor befinden sich zwei Sequenzen mit der Basenabfolge TAAT. Diese könnten mit zwei dort ebenfalls vorhandenen ATTA-Basenabfolgen verschiedene palindromische Sequenzen ausbilden, die als Bindestelle für AlsR im *alsSD* Promotor in Frage kommen könnten (Abb. 26). Für LTTRs ist bekannt, dass sie an palindromische DNA-Sequenzen mit der minimalen Konsensus-Sequenz T-N₁₁-A binden (Schell, 1993). Dies ist im *alsSD* Promotor der Fall für das zweite TAAT in Kombination mit dem zweiten ATTA (Abb. 26). Da allerdings die Anzahl der Nukleotide zwischen dem T und dem A von 11 Nukleotiden abweichen kann, sind die weiteren in Abb. 26 gezeigten palindromischen Sequenzen ebenso mögliche Bindestellen für AlsR. Nicht nur die Basenabfolge sondern auch die Position der von AlsR protektierten Region im *alsSD* Promotor stimmt mit der anderer LTTRs und ihrer Zielgene bzw. -operons

überein. Die Erkennungssequenz („*recognition bindings site*“, RBS) von LTTRs befindet sich meist im Bereich um Position -65 in Bezug auf den jeweiligen Transkriptionsstartpunkt des regulierten Gens oder Operons (Maddocks and Oyston, 2008; Schell, 1993). Dies ist bei AlsR mit einer protektierten Region von Position -81 bis -52 (kodierender Strang) bzw. von -82 bis -54 (nicht-kodierender Strang) in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons der Fall. Für LTTRs ist weiterhin bekannt, dass sie zusätzlich zur Bindung an die RBS noch an eine weitere Stelle im jeweiligen Promotor binden, die sich in der Nähe der -35 Region befindet („*activa-ting binding site*“, ABS). Dies konnte hier für AlsR nicht gezeigt werden. Einem Modell zufolge bindet ein LTTR-Dimer effektorunabhängig an die RBS, gefolgt von einer effektorabhängigen Bindung eines zweiten Dimers. Durch eine hieraus resultierende Konformationsänderung könnte das zweite Dimer daraufhin mit der ABS interagieren und die Transkription des Zielgens aktivieren (McFall *et al.*, 1998). Da der Effektor von AlsR bislang nicht bekannt ist, wurden die DNaseI-Protektionsanalysen ohne Zugabe eines solchen durchgeführt. Dies könnte das Fehlen einer zweiten protektierten Region, welche die ABS repräsentieren würde, erklären.

4.2.2 Der Einfluss des Bindebereichs von AlsR im *alsSD* Promotor auf *alsS-lacZ* Reporterfusionen

Um die *in vitro* durch DNaseI-Protektionsanalysen bestimmte AlsR-Bindestelle im *alsSD* Promotor weiter zu charakterisieren, wurden *alsS-lacZ* Reporterfusionen mit verschiedenen Promotorlängen hergestellt. Dazu wurde der *alsSD* Promotor am 5'-Ende schrittweise verkürzt und jeweils mit dem *lacZ* Gen fusioniert. Diese Konstrukte wurden durch homologe Rekombination in den *amyE*-Locus des *B. subtilis* Stamms JH642 integriert. Die so entstandenen *B. subtilis* Stämme wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Als Standard für eine volle Induktion der Expression des *alsSD* Operons unter den gewählten Wachstumsbedingungen wurde der *B. subtilis* Stamm AMBs9 (Tab. 4) verwendet, bei welchem in den *amyE*-Locus eine *alsS-lacZ* Reporterfusion mit einer Promotorlänge von 86 bp integriert wurde. Eine Verkürzung des *alsSD* Promotors auf eine Länge von 72 bp (*B. subtilis* Stamm AMBs12) führte zu einer Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität von 1.175 auf 22 Miller-Units, was einer Reduktion um 92,1 % ent-

spricht (Abb. 27). Weitere Verkürzungen des *alsSD* Promotors auf 62 bp (AMBs13), 56 bp (AMBs14) und 50 bp (AMBs11) führten zu einem kompletten Verlust der β -Galaktosidaseaktivität auf Werte von ≤ 5 Miller-Units (Abb. 27).

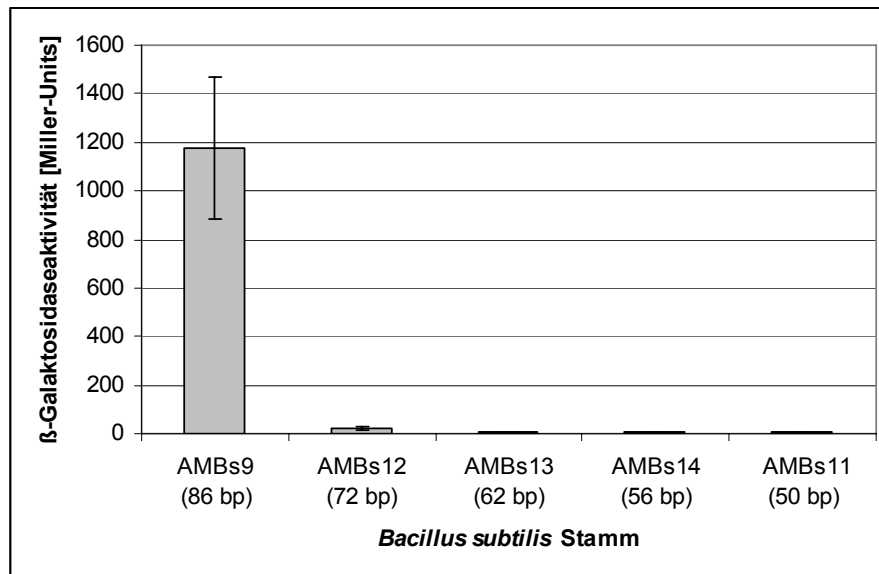


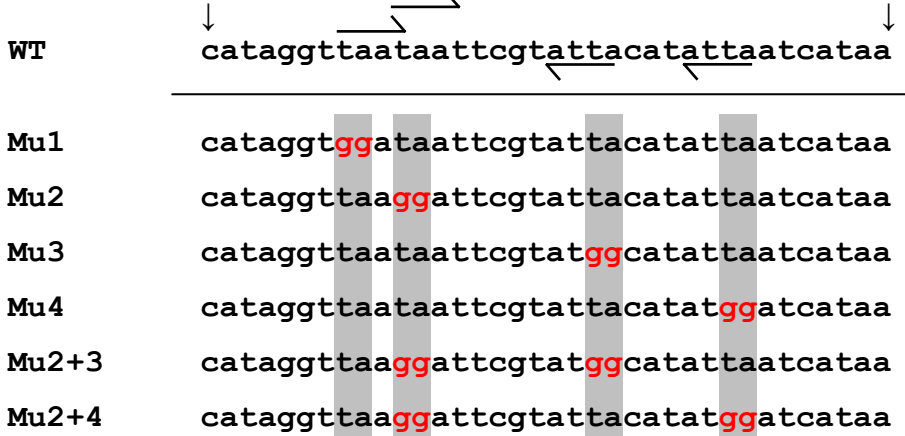
Abb. 27 Die β -Galaktosidaseaktivität verkürzter Promotorfragmente des *alsSD* Operons. Dargestellt sind die β -Galaktosidaseaktivitäten in den *Bacillus subtilis* Stämmen AMBs9, AMBs12, AMBs13, AMBs14 und AMBs11, die unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat bis in die exponentielle Wachstumsphase kultiviert wurden. Die Längen der *alsSD* Promotorfragmente, die jeweils mit dem *lacZ* Gen fusioniert wurden, sind in Klammern unter der Stammbezeichnung angegeben. Der Stamm AMBs9 zeigt mit 1.175 Miller-Units eine typische *alsS-lacZ* Expressionsrate, die weiteren Stämme zeigen lediglich eine sehr schwache (AMBs12) oder keine *alsS-lacZ* Expression (AMBs13, AMBs14 und AMBs11).

Da die Verkürzung des *alsSD* Promotors von 86 auf 72 bp bereits zu einem nahezu vollständigen Verlust der β -Galaktosidaseaktivität führte, muss mindestens ein Teil der AlsR-Bindestelle innerhalb der Basenpaare an den Positionen -86 bis -72 lokalisiert sein. Zwischen Position -86 und -72 befindet sich an den Positionen -79 bis -76 und -76 bis -73 jeweils die Sequenz TAAT (Abb. 26). Diese Sequenzen könnten jeweils einen Teil eines Palindroms mit der Sequenz ATTA an Position -68 bis -65 bzw. an Position -61 bis -58 darstellen (Abb. 26). Um zu bestimmen, welches dieser potentiellen Palindrome im *alsSD* Promotor die Kontaktstelle für AlsR darstellt, wurden ortsgerichtete Mutagenesen in dieser Region des Promotors durchgeführt.

4.2.3 Definition der für die AlsR-Bindung essentiellen Basenpaare im Promotor des *alsSD* Operons durch ortsgerichtete Mutagenese

Um zu bestimmen, welches palindromische TAAT-N_x-ATTA Motiv innerhalb des Bindebereichs die Kontaktstelle für AlsR darstellt, wurden in den Promotor des

-86 -51



Die mutierten 86 bp langen Promotoren wurden mit dem *lacZ* Gen fusioniert, und diese Fusionen in den *amyE*-Locus des *B. subtilis* Stamms JH642 integriert. Die daraus resultierenden Stämme AMBs18 (Mu1), AMBs19 (Mu2), AMBs20 (Mu3), AMBs21 (Mu4), AMBs22 (Mu2+3) und AMBs23 (Mu2+4) wurden unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat bis in die exponentielle Wachstumsphase kultiviert, und die β -Galaktosidaseaktivität wurde bestimmt. Als Standard für eine volle Induktion der Expression des *alsSD* Operons wurde erneut der *B. subtilis* Stamm AMBs9 (Tab. 4) verwendet. Er wird im Folgenden als WT-Stamm betrachtet. Die Stämme AMBs18 (Mu1) und AMBs20 (Mu3) zeigten keine relevante Reduktion der *alsS-lacZ* Expression im Vergleich zum WT (Abb. 29). Jedoch zeigten die Stämme AMBs19 (Mu2) und AMBs21 (Mu4) eine drastische Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität verglichen mit dem WT. Sie zeigten lediglich noch eine β -Galaktosidaseaktivität von 63 bzw. 43 Miller-Units (Abb. 29). Verglichen mit der

β-Galaktosidase-

Stamm	relevante Sequenz	aktivität [Miller -Units]
AMBs9 (WT)	cataggttaataattcgtattacatattaatcataa	1136 ± 147
AMBs18 (Mu1)	cataggtg ^a gataattcgtattacatattaatcataa	939 ± 235
AMBs19 (Mu2)	cataggttaag ^a gattcgtattacatattaatcataa	63 ± 18
AMBs20 (Mu3)	cataggttaataattcgtatgg ^a catattaatcataa	976 ± 378
AMBs21 (Mu4)	cataggttaataattcgtattacatatgg ^a atcataa	43 ± 0
AMBs22 (Mu2+3)	cataggttaag ^a gattcgtatgg ^a catattaatcataa	42 ± 0
AMBs23 (Mu2+4)	cataggttaag ^a gattcgtattacatatgg ^a atcataa	≤ 5

-76 N₁₁ -58

Abb. 29 Ortsgerichtete Mutagenesen des *alsSD* Promotors und deren Einfluss auf die *alsS-lacZ* Expression. Dargestellt sind die *B. subtilis* Stämme mit dem relevanten Ausschnitt der Sequenz ihrer jeweiligen *alsS-lacZ* Reporter-genfusion sowie die zugehörige β -Galaktosidaseaktivität. Basenaustausche sind rot markiert und grau hinterlegt. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die Einzelmutationen an Position -79/-78 (Mu1) und -66/-65 (Mu3) haben keinen Effekt auf die Stärke der *alsS-lacZ* Expression. Mutationen an Position -76/-75 (Mu2) oder -59/-58 (Mu4) führen zu einer ebenso drastischen Reduktion der *alsS-lacZ* Expression wie die Kombination aus den Mutationen an Position -76/-75 und -66/-65 (Mu2+3). Die Kombination der Mutationen an den Positionen -76/-75 und -59/-58 (Mu2+4) führt zu einem kompletten Verlust der *alsS-lacZ* Expression.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Basenabfolge TA an Position -79/-78 (Mu1) keine Relevanz für die Bindung von AlsR an den *alsSD* Promotor besitzt, während die Basen TA an Position -76/-75 (Mu2) und -59/-58 (Mu4) wahrscheinlich für die Bindung von AlsR an den *alsSD* Promotor benötigt werden (Ab. 29). Durch Kombination der Basenaustausche Mu2 und Mu4 (Mu2+4) erfolgte keinerlei Aktivierung der *alsS-lacZ* Expression mehr. Die Bindestelle von AlsR im *alsSD* Promotor ist also an Position -76 bis -58 in Relation zum Transkriptionsstartpunkt lokalisiert. Sie besitzt die Sequenz TAAT-N₁₁-ATTA und wird im Folgenden als AlsR-Box bezeichnet.

Bei näherer Betrachtung der AlsR-Box fallen innerhalb dieser weitere Basen auf, die eine zusätzliche palindromische Sequenz bilden könnten. An Position -70/-68 befindet sich das Motiv GTA welches ein Palindrom mit der Sequenz TAC an Position -66/-64 bilden könnte. Innerhalb dieses GTA-N₁-TAC Palindroms befindet sich an Position -66/-65 der Basenaustausch Mu3. Mu3 zeigte zwar als Einzelmutation keine reduzierte *alsS-lacZ* Expression, führte jedoch in Kombination mit Mu2 (Mu2+3) zu einer geringeren *alsS-lacZ* Expression als die Einzelmutation Mu2 (Abb. 29). Daher könnte die palindromische Sequenz GTA-N₁-ATC innerhalb des TAAT-N₁₁-ATTA Palindroms eine untergeordnete Rolle bei der Bindung von AlsR an den *alsSD* Promotor spielen. In diesem Fall könnte die definierte Sequenz der palindromischen Bindestelle auf TAAT-N₂-GTA-N₁-ATC-N₂-ATTA erweitert werden. Um dies zu bestätigen, müssten weitere Mutationen in diesem Bereich eingeführt und anschließend ihre *alsS-lacZ* Reportergenaktivität getestet werden.

Die postulierte AlsR-Box mit der Sequenz TAAT-N₁₁-ATTA stimmt mit der für LTTRs postulierten Konsensus-Sequenz T-N₁₁-A überein. Das Zentrum der AlsR-Box befindet sich im *alsSD* Promotor an Position -67 im Verhältnis zum Transkriptionsstartpunkt. Auch dies ist in voller Übereinstimmung mit anderen LTTRs, die um den Bereich an Position -65 in Relation zum Transkriptionsstartpunkt ihres jeweiligen Zielgens oder -operons binden und deren Transkription aktivieren (Maddocks and Oyston, 2008). Da die Kombination der Mutationen Mu2 und Mu4 (Mu2+4) zu einem vollständigen Verlust der β -Galaktosidaseaktivität der verwendeten *alsS-lacZ* Reportergenfusion führte, sollte durch DNA-Bindungsstudien nun gezeigt werden, ob AlsR *in vitro* die Fähigkeit zur Bindung an ein entsprechendes DNA-Fragment hat.

4.2.4 Bestätigung postulierten AlsR-Box durch *in vitro* Gelretardationsanalysen

Um zu bestimmen, ob AlsR an die *in vivo* definierte AlsR-Box im *alsSD* Promotor *in vitro* binden kann, wurden erneut Gelretardationsanalysen durchgeführt. Bei diesen wurde zusätzlich zum radioaktiv markierten 42 bp langen DNA-Fragment auch ein nicht-markiertes DNA-Fragment, das in Länge und Sequenz identisch mit der markierten DNA war, im Überschuss zugegeben. Bei einer spezifischen Bindung von AlsR an das markierte *alsSD* Promotorfragment sollte der resultierende AlsR/DNA-Komplex durch Zugabe eines Überschusses an nicht-markierter DNA im

Acrylamidgel nicht mehr sichtbar sein. Dies ist darin begründet, dass die Bildung eines AlsR/DNA-Komplexes bei einem Überschuss an nicht-markierter DNA mit dieser statistisch um ein Vielfaches häufiger auftritt als mit markierter DNA.

In einem weiteren Ansatz wurde nicht-markierte DNA zugegeben, die an den Positionen -76/-75 und -59/-58 in Relation zum Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons jeweils Basenaustausche von TA zu GG enthielt. In seiner Länge und der restlichen Sequenz war dieses Fragment jedoch identisch mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment. Die Basenaustausche entsprachen denen des *alsSD* Promotorkonstrukts Mu2+4 (Abb. 28 und 29), welches in Stamm AMBs23 *in vivo* keinerlei *alsS-lacZ* Expression im β -Galaktosidase Enzymtest mehr aufwies (Abb. 29). Wenn diese Basen die Bindung von AlsR an den *alsSD* Promotor vermitteln, sollte das mutierte DNA-Fragment nicht in der Lage sein, den gebildeten AlsR/DNA-Komplex mit dem markierten DNA-Fragment zu kompetieren.

AlsR wurde zu allen Ansätzen in einer Menge von 2,9 pmol zugegeben, da diese Menge in Kombination mit 0,1 pmol markierter DNA für einen deutlich sichtbaren DNA-Protein-Komplex im Acrylamidgel geeignet ist (Abb. 22). Als Kontrolle wurde das DNA-Fragment einmal ohne Zugabe von AlsR inkubiert. Die Zugabe von 2,9 pmol AlsR zum radioaktiv-markierten DNA-Fragment ergab die bereits zuvor beobachteten AlsR/DNA-Komplexe Shift 1 und Shift 2 (Abb. 30, Spur 2). Die zusätzliche Zugabe des unmarkierten, nicht-mutierten *alsSD* Promotorfragments führte bereits bei einem 10fachen Überschuss zu einer drastischen Reduktion der AlsR/DNA-Komplexe mit der markierten DNA (Abb. 30, Spur 3). Die Zugabe des nicht-markierten Fragments in 50fachem Überschuss bewirkte, dass nur noch 7 % der ursprünglichen AlsR/DNA-Komplexe vorhanden waren (Abb. 30, Spur 4). Bei 100fachem Überschuss an nicht-markiertem *alsSD* Promotorfragment wurde der AlsR/DNA-Komplex schließlich vollständig kompetiert (Abb. 30, Spur 5).

Die Zugabe des nicht-markierten *alsSD* Promotorfragments, welches die oben beschriebenen Basenaustausche enthielt, führte weder bei einem 10fachen, 50fachen noch 100fachen Überschuss zu einer Kompetition der AlsR/DNA-Komplexe mit dem markierten *alsSD* Promotorfragment (Abb. 30, Spur 6-8).

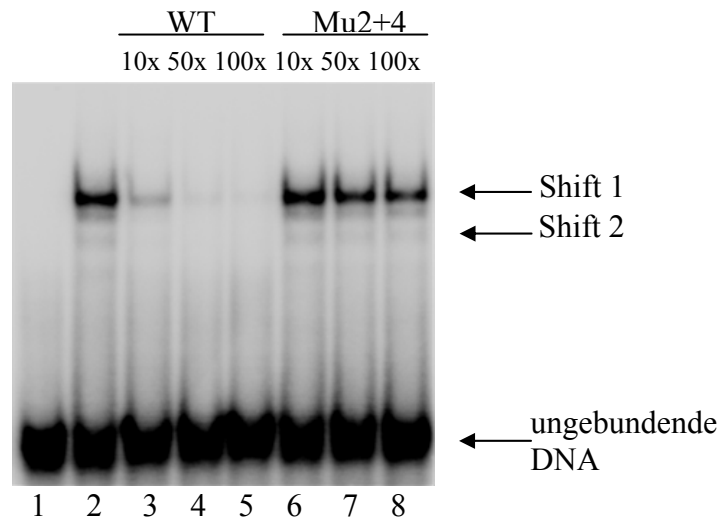


Abb. 30 Gelretardationsanalyse eines *alsSD* Promotorfragments mit AlsR und verschiedenen DNA-Fragmenten zum Test auf Konkurrenz. Dargestellt ist ein 42 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors repräsentiert. Es wurden jeweils 0,1 pmol radioaktiv markierte DNA und 2,9 pmol AlsR eingesetzt. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). Als Standard für einen regulären AlsR/DNA-Komplex wurden 2,9 pmol AlsR ohne Kompetitor-DNA eingesetzt (Spur 2). Zusätzlich wurden 1,0 pmol (10x Überschuss, Spur 3 und 6), 5,0 pmol (50x Überschuss, Spur 4 und 7) sowie 10,0 pmol (100x Überschuss, Spur 5 und 8) nicht-markiertes WT-Fragment (Spur 3-5) oder Mu2+4-Fragment (Spur 6-8) hinzugefügt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde getrocknet, 4 h auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaser-scanner visualisiert. Die Zugabe von 2,9 pmol AlsR zu 0,1 pmol markierter DNA führt zu einem AlsR/DNA-Komplex (Spur 2). Die Zugabe von 1,0 pmol unmarkiertem WT-Fragment führte bereits zu einer sichtbaren Reduktion dieses Komplexes (Spur 3). Die Zugabe von 5,0 pmol bzw. 10 pmol unmarkiertem WT-Fragment verstärkte diesen Effekt bis zur nahezu vollständigen Konkurrenz (Spur 4 und 5). Das Mu2+4-Fragment führte weder in 10-fachem (Spur 6), 50-fachem (Spur 7) noch 100-fachem (Spur 8) Überschuss zu einer Konkurrenz des AlsR/DNA-Komplexes.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Austausch der Basen TA zu GG an den Positionen -76/-75 und -59/-58 (Mu2+4) keine Bindung von AlsR an ein entsprechendes *alsSD* Promotorfragment mehr erfolgen kann. Dies bestätigt die postulierte AlsR-Box TAAT-N₁₁-ATTA an Position -65 in Relation zum Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons.

4.3 Der Effektor von AlsR aus *Bacillus subtilis*

LTTRs benötigen für ihre Aktivität einen Effektor, der an ihre C-terminale Domäne bindet und dadurch erst die Transkription des Zielgens oder -operons ermöglicht (Schell, 1993). Dieser Effektor stellt oft ein Substrat oder ein Zwischenprodukt des Stoffwechselwegs dar, der durch den LTTR reguliert wird (Schell, 1993). Es ist bereits bekannt, dass fermentative Wachstumsbedingungen, die Zugabe von Acetat, die Stationärphase sowie die Reduktion des externen pH-Werts jeweils einzeln einen induzierenden Einfluss auf die Expression des *alsSD* Operons haben (Cruz Ramos *et*

al., 2000; Renna *et al.*, 1993; Turinsky *et al.*, 2000). Werden diese einzelnen Faktoren miteinander kombiniert, resultiert dies in einer noch stärkeren Expression einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion (March, 2005). Acetat wurde als Effektor von AlsR postuliert, da die AlsR-abhängige *alsSD* Expression durch Zugabe von Acetat ins Wachstumsmedium induziert werden kann (Renna *et al.*, 1993). Acetat akkumuliert unter fermentativen Wachstumsbedingungen und in der aeroben Stationärphase, Bedingungen unter denen ebenfalls eine *alsSD* Induktion zu finden ist (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Renna *et al.*, 1993). Daher kommt Acetat als Effektor von AlsR in Frage. Ein verringerter pH-Wert wurde ebenfalls als ein möglicher Effektor von AlsR postuliert (Renna *et al.*, 1993). Es wäre möglich, dass es durch die Synthese von großen Mengen Acetat zu einer Änderung des internen pH-Werts der Zellen kommt, so dass die *alsSD* Expression unter allen beschriebenen Bedingungen statt durch Acetat auch durch einen reduzierten pH-Wert induziert werden könnte.

4.3.1 Der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) als potentieller Effektor von *Bacillus subtilis* AlsR

Die Verringerung des externen pH-Werts (pH_{ex}) auf 6 führte in *B. licheniformis* zu einer erhöhten Expression des *alsSD* Operons im Vergleich zu der bei einem neutralen pH-Wert des Mediums (Turinsky *et al.*, 2000). Auch für *B. subtilis* wurde durch Microarray-Analysen kürzlich gezeigt, dass eine Verringerung des pH_{ex} von 7 auf 6 in einer erhöhten *alsSD* Expression resultiert (Wilks *et al.*, 2009). Es stellt sich nun die Frage, ob die Verringerung des pH_{ex} einen Einfluss auf den pH_i hat.

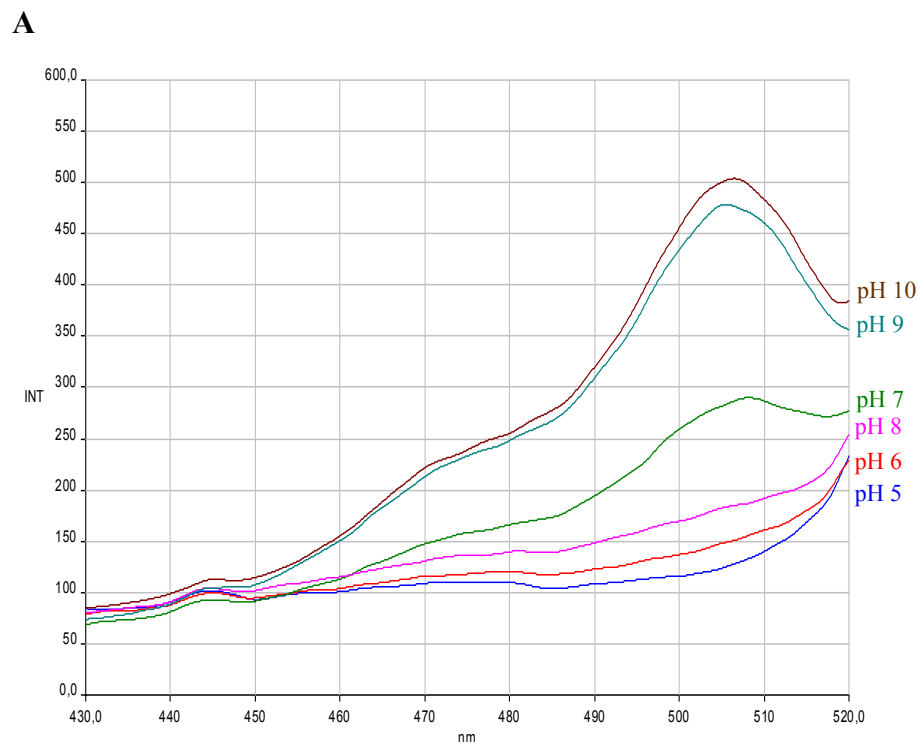
Während fermentativer Wachstumsbedingungen werden die sauren Fermentationsprodukte Acetat und Lactat von *B. subtilis* synthetisiert. Um einer Ansäuerung des Cytoplasmas durch diese Säuren entgegenzuwirken, können sie ins umgebende Medium sezerniert werden, welches dadurch angesäuert werden könnte. Werden sehr große Mengen Acetat und Lactat gebildet, könnte es durch deren Akkumulation trotzdem zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas kommen. Dieser verringerte pH_i könnte ein effektorisches Signal von AlsR sein. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat ist die Expression einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion verglichen mit fermentativen Wachstumsbedingungen um etwa die Hälfte reprimiert (March, 2005). Da es bei der Nitratatmung im Gegensatz zur Fermentation nicht zur Bildung saurer Fermentationsprodukte kommt, sollte unter diesen Bedingungen keine Änderung des pH_i erfolgen. Um den pH_i als möglichen Effektor von AlsR zu

untersuchen, wurde der pH_i von *B. subtilis* daher unter fermentativen Wachstumsbedingungen sowie unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat bestimmt.

Für cytoplasmatische pH-Messungen wurde der pH-abhängige Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluorescein (BCECF) verwendet. Die Fluoreszenzintensität von BCECF ist pH-abhängig. Bei niedrigen pH-Werten ist sie geringer als bei einem hohen pH-Wert. Wird BCECF mit Licht der Wellenlängen 420 bis 530 nm angeregt, kann bei einer konstanten Emissionswellenlänge von 535 nm ein Exzitationsspektrum von BCECF aufgenommen werden. In diesem Spektrum befindet sich bei 505 nm das pH-abhängige Fluoreszenzmaximum und bei 439 nm ein pH-unabhängiger isobestischer Punkt. BCECF kann als nicht-fluoreszierender Acetoxymethyl-Ester (BCECF-AM) in das Cytoplasma von *B. subtilis* JH642 Zellen aufgenommen werden. Im Cytoplasma erfolgt die Abspaltung der Esterbindung durch Esterasen. Dadurch entsteht BCECF, was im Gegensatz zu BCECF-AM nicht membranpermeabel ist.

Für die Messung des pH_i von *B. subtilis* unter fermentativen Wachstumsbedingungen sowie anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat wurde zunächst eine Eichreihe angefertigt. Hierfür wurden mit BCECF beladene Zellen in glukosehaltigen TES- bzw. Glyzin-Puffern mit pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 und pH 10 mit dem Ionophor Gramicidin (Endkonzentration 20 μM) inkubiert. Dies führte zur Bildung von Ionenkanälen in der Zellmembran und zu einem Angleichen des pH_i an den pH_{ex} . Anschließend wurde die Fluoreszenz der mit BCECF beladenen Zellen mit Wellenlängen von 420 bis 530 nm angeregt und es wurde bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm ein Exzitationsspektrum aufgenommen (Abb. 31). Dies wurde sowohl für fermentativ (Abb. 31 A) als auch für anaerob mit Nitrat kultivierte Zellen durchgeführt (Abb. 31 B). Die Fluoreszenzintensität bei 505 nm stieg sowohl bei fermentativ (Abb. 31A) als auch bei anaerob mit Nitrat (Abb. 31 B) kultivierten Zellen mit steigendem pH_{ex} an. Dies bedeutet, dass die Angleichung des pH_i an den pH_{ex} durch das Ionophor Gramicidin erfolgreich war. Bei pH_i 5 und pH_i 6 war bei 505 nm jeweils kein Fluoreszenzmaximum in Form eines Peaks im Exzitationsspektrum erkennbar (Abb. 31 A und B). Dies ist dadurch erklärbar, dass BCECF bei kleinen pH-Werten nur schwach fluoresziert. Bei Zellen mit pH_i 7 war jeweils ein deutlicher Peak bei 505 nm erkennbar (Abb. 31 A und B). Bei fermentativ kultivierten Zellen mit pH_i 8 war kein Peak bei 505 nm erkennbar (Abb. 31 A),

jedoch bei solchen, die anaerob mit Nitrat kultiviert wurden (Abb. 31 B). Es wäre möglich, dass die Angleichung des pH_{ex} an den pH_{i} bei den fermentativ kultivierten Zellen in diesem Fall nicht optimal verlaufen ist. Zusätzlich war auffällig, dass die Fluoreszenz von Zellen mit pH_{i} 7 sowohl bei fermentativ als auch bei anaerob mit Nitrat kultivierten Zellen höher war als bei pH_{i} 8. Da der pH_{ex} der verwendeten Medien während des Experiments mit pH-Indikatorstäbchen kontrolliert wurde, ist diese Varianz nicht durch einen abweichenden pH_{ex} erklärbar. Im Vergleich zu den niedrigeren pH-Werten war die Fluoreszenzintensität von BCECF bei pH_{i} 9 und 10 stärker. Bei fermentativ kultivierten Zellen war die Fluoreszenzintensität von Zellen mit pH_{i} 10 geringfügig höher als mit pH_{i} 9 (Abb. 31 A). Bei anaerob mit Nitrat kultivierten Zellen war die Fluoreszenzintensität von Zellen mit pH_{i} 9 und pH_{i} 10 vergleichbar. Dass BCECF besonders gut für pH_{i} -Bereiche von 6 bis 9,5 geeignet ist, könnte erklären, warum sich die Fluoreszenzintensitäten von pH_{i} 9 und 10 ähneln. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Angleichung des pH_{ex} an den pH_{i} erfolgreich war, so dass Eichkurven erstellt werden konnten.



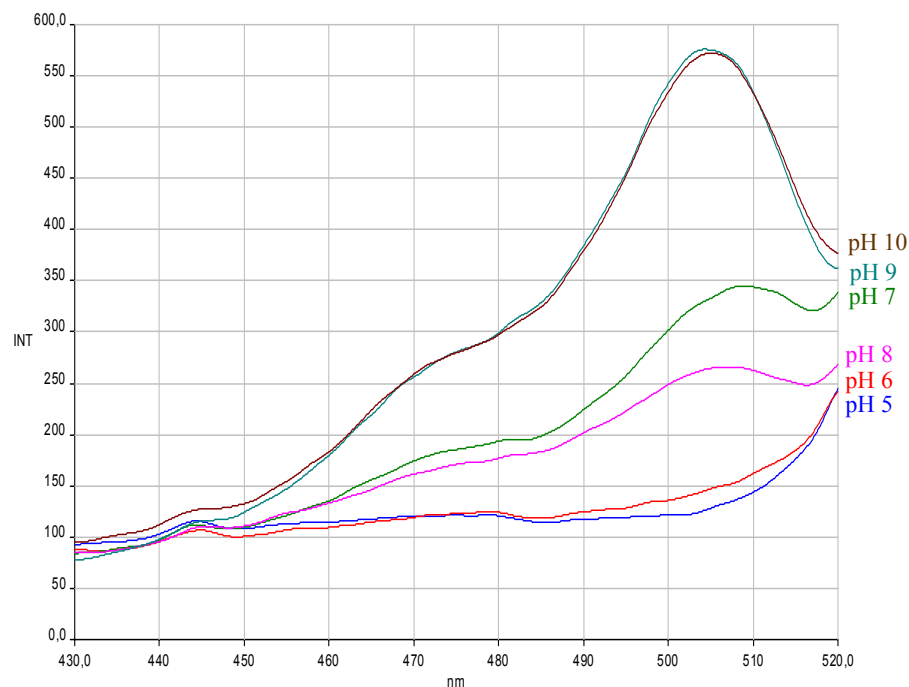
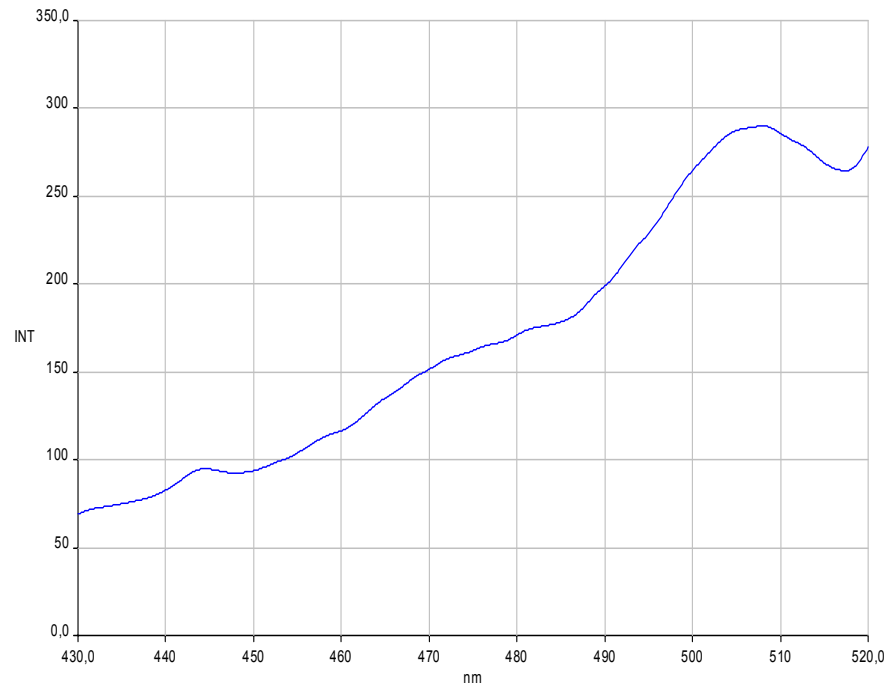
B

Abb. 31 Eichreihen zur Bestimmung des pH_i von *Bacillus subtilis* Kulturen unter fermentativen Wachstumsbedingungen (A) und anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat (B). Dargestellt sind die Exzitationsspektren der Eichreihen für den *B. subtilis* Stamm JH642. Die Emissionswellenlänge betrug 535 nm. JH642 wurde fermentativ (A) bzw. anaerob mit Nitrat (B) in SMM-Medium bei 37 °C und 100 rpm in Transfusionsflaschen mit Septen bis zum Erreichen der Stationärphase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit BCECF beladen und dann in Puffern mit dem pH-Wert 5,0 (blaue Linie), 6,0 (rote Linie), 7,0 (grüne Linie), 8,0 (magentafarbene Linie), 9,0 (türkisfarbene Linie) bzw. 10,0 (braune Linie) überführt und jeweils mit 20 μM Gramicidin behandelt, so dass der pH_{ex} dem pH_i entsprach. Je höher der pH_i , desto höher ist auch die Fluoreszenz-Intensität (INT) von BCECF. Das Fluoreszenzmaximum von BCECF befindet sich bei 505 nm.

Bei einer Wellenlänge von 439 nm ist die Fluoreszenzintensität von BCECF bei allen pH-Werten identisch. Daher können die erhaltenen Daten durch Bildung eines Quotienten aus der Fluoreszenzintensität der pH-abhängigen Wellenlänge (505 nm) und der Fluoreszenzintensität der pH-unabhängigen Wellenlänge (439 nm) nomalisiert werden. Die erhaltenen Quotienten wurden anschließend jeweils gegen den zugehörigen pH_i aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Anhand der daraus resultierenden Eich- und Regressionskurven konnte der pH_i von *B. subtilis* JH642 unter fermentativen sowie anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen bis zum Erreichen der Stationärphase inkubiert und mit BCECF beladen. Nach mehreren Waschschritten wurde die Fluoreszenzintensität durch Aufnahme von Exzitationsspektren mit einer Emissionswellenlänge von 535 nm bestimmt (Abb. 32 A und B). Die Fluoreszenzintensität der fermentativ kultivierten Zellen betrug im Fluoreszenzmaximum von 505 nm 290 Einheiten

(Abb. 32 A), die von anaerob mit Nitrat kultivierten Zellen 330 Einheiten (Abb. 32 B).

A fermentativ



B anaerob mit Nitrat

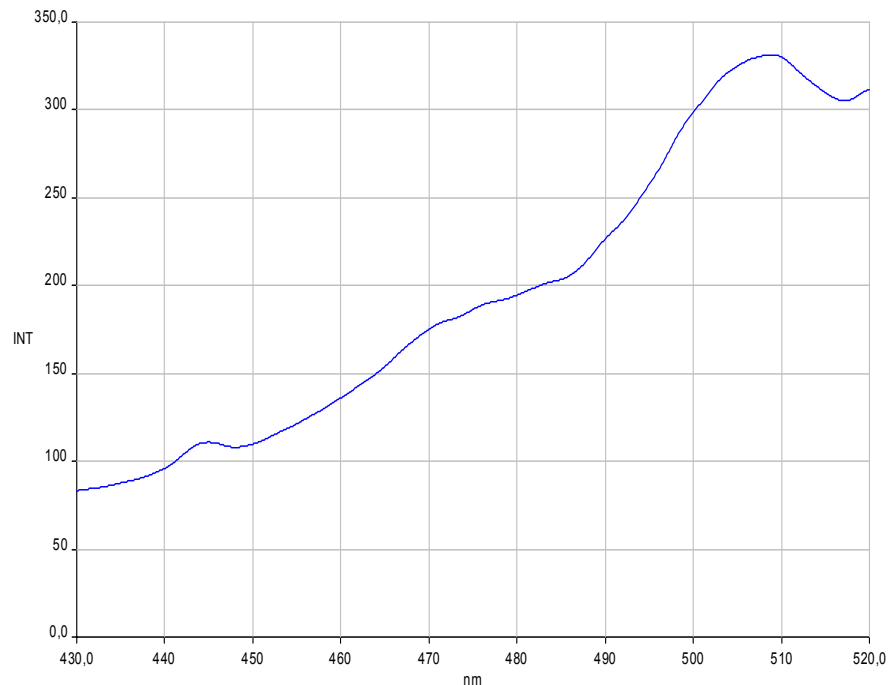


Abb. 32 Messung der Fluoreszenz-Intensität von *Bacillus subtilis* JH642 Zellen, die unter fermentativen Wachstumsbedingungen (A) und anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat (B) kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Exzitationsspektrum, das bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm aufgenommen wurde. Die Fluoreszenz-Intensitäten sind dargestellt. *B. subtilis* JH642 wurde fermentativ (A) bzw. anaerob mit 10 mM Nitrat (B) in SMM-Medium bei 37 °C und 100 rpm in Transfusionsflaschen mit Septen bis zum Erreichen der Stationärphase kultiviert, mit BCECF beladen und die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Zur Normalisierung wurde für beide Proben wie zuvor beschrieben der Quotient aus der pH-abhängigen und der pH-unabhängigen Wellenlänge gebildet. Mit diesen Werten und den zuvor erhaltenen Regressionsgeraden konnte der pH_i der fermentativ und anaerob mit Nitrat kultivierten Zellen bestimmt werden. In Übereinstimmung damit, dass bereits die Exzitationsspektren der verschiedenen kultivierten Zellen eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, ergaben sich für beide Kultivierungen fast identische pH_i -Werte. Für fermentativ kultivierte Zellen wurde ein pH_i von 7,5, für anaerob mit Nitrat kultivierte Zellen ein pH_i von 7,4 ermittelt. Dies bedeutet, dass *B. subtilis* seinen pH_i auch unter Bedingungen, bei denen organische Säuren akkumulieren könnten, über pH-Homöostase konstant hält. Unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat ist die Expression einer *alsS-lacZ* Reportergenfusion im Vergleich zu fermentativen Wachstumsbedingungen um etwa die Hälfte reprimiert (March, 2005). Da sich der pH_i von fermentativ und anaerob mit 10 mM Nitrat kultivierten Zellen jedoch kaum unterscheidet, ist es unwahrscheinlich, dass er einen Effektor von AlsR darstellt. Er könnte allerdings indirekt einen induzierenden Einfluss auf die Expression des *alsSD* Operons haben. Bei niedrigem extrazellulären (pH 6) und neutralem intrazellulären pH-Wert (pH 7), wie es hier für *B. subtilis* der Fall ist, kann es in der Zelle zur Akkumulation von Acetat kommen, da Acetat und andere organische Säuren unter diesen Bedingungen dissoziiert im Cytoplasma vorliegen und nicht aus der Zelle ausgeschleust werden können (Kashket, 1987).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode zur Bestimmung des pH_i noch weiterer Optimierung bedarf. Zum einen ist die Methode nicht vollständig unter anaeroben Bedingungen durchführ- und messbar. Zum anderen müsste eine schnellere Methode zur pH_i -Bestimmung gefunden werden, da durch die lange Dauer des gesamten Experiments von der Zellernte bis zur Fluoreszenzmessung nicht gewährleistet ist, dass der letztendlich gemessene pH_i demjenigen während der Kultivierung entspricht. Eine zeitunabhängige Methode könnte durch den Einsatz von fluoreszierenden Proteinen, wie z.B. GFP, deren entsprechende kodierende Gene zuvor in das *B. subtilis* Genom integriert werden können, entwickelt werden. Die Fluoreszenz von GFP ist jedoch sauerstoffabhängig. Wichtig wäre jedoch, dass sie sauerstoffunabhängig erfolgen kann, um den pH_i unter anaeroben Bedingungen bestimmen zu können. Ein Beispiel hierfür wäre das Flavin-basierte fluoreszierende Protein aus *B. subtilis* (BsFbFP), welches ein Derivat des Blaulicht-Rezeptors aus *B. subtilis* ist. Dessen Fluoreszenz ist, im Gegensatz zu der von beispielsweise GFP

und GFP-Derivaten, unabhängig von der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (Drepper *et al.*, 2007). Würde man das entsprechende Gen mit einem induzierbaren Promotor in das Genom von *B. subtilis* integrieren, könnte die Fluoreszenz direkt ohne weitere nötige Schritte gemessen werden. Allerdings ist für BsFbFP bislang keine pH-abhängige Fluoreszenz bekannt. Daher müsste BSFbFP erst auf eine solche getestet werden.

4.3.2 Stoffwechselprodukte der Fermentation als potentielle Effektoren von AlsR

Effektoren von LTTRs sind oftmals Substrate oder Intermediate der von ihnen regulierten Stoffwechselwege (Schell, 1993). Beispielsweise reguliert CbnR die Expression des *cbnABCD* Operons, dessen Genprodukte für die Degradation von Chlorocatechol verantwortlich sind (Ogawa *et al.*, 1999). Bei der Degradation von Chlorocatechol entsteht als eines der Intermediate Muconat, welches der Effektor von CbnR ist (Ogawa *et al.*, 1999).

Acetat wurde bereits als ein Effektor von AlsR postuliert, da eine acetatabhängige Expression des *alsSD* Operons beobachtet wurde (Renna *et al.*, 1993). Um den Effektor von AlsR durch *in vivo* Analysen näher zu bestimmen, wurde der Einfluss von Acetat auf die Expression einer *alsS-lacZ* Reportergenfusion im *B. subtilis* Stamm HRB7 (Tab. 4) unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen gemessen. Im Vergleich dazu wurde der Einfluss von Lactat, Acetoin und Butandiol, die Produkte des fermentativen Stoffwechsels von *B. subtilis* sind, sowie von Glutamat und Succinat bestimmt.

Die Zugabe von 40 mM Acetat zum Kulturmedium führte sowohl unter aeroben als auch fermentativen Wachstumsbedingungen zu einer induzierten Expression der *alsS-lacZ* Reportergenfusion (Tab. 12). Die Zugabe von 40 mM Lactat zum Kulturmedium führte unter aeroben Bedingungen zu keiner Änderung der *alsS-lacZ* Expression, jedoch unter fermentativen Wachstumsbedingungen. Diese Steigerung war mit der unter fermentativen Wachstumsbedingungen und Zugabe von 40 mM Acetat vergleichbar (Tab. 12). Es ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich, warum Lactat nur unter fermentativen Bedingungen einen Einfluss auf die *alsS-lacZ* Expression zeigt. Eine Möglichkeit wäre, dass Lactat unter aeroben Bedingungen von *B. subtilis* nicht in die Zellen aufgenommen wird und daher die *alsS-lacZ* Expression nicht beeinflusst hat. Dies könnte durch die anaerobe Expression des *ldh-lctP* Operons

bedingt sein, welches für die Lactatdehydrogenase und eine Lactatpermease (LctP) kodiert. Bislang ist nicht bekannt, ob LctP ausschließlich für die Sezernierung von Lactat verantwortlich ist oder auch für die Aufnahme von Lactat unter fermentativen Bedingungen verantwortlich sein könnte.

Tab. 12 Der Einfluss von Acetat und Lactat auf die Expression von *alsS-lacZ*. Der *Bacillus subtilis* Stamm HRB7 wurde unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen mit den angegebenen Zusätzen in SMM-Medium kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der relevante Genotyp des Stamms ist in Klammern angegeben. Die Daten repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben.

HRB7 (<i>amyE::-341alsS-lacZ</i>)	β-Galaktosidaseaktivität [Miller-Units]	
	aerob	fermentativ
ohne Zusatz	35 \pm 3	460 \pm 92
40 mM Acetat	202 \pm 40	1150 \pm 176
40 mM Lactat	30 \pm 3	1031 \pm 171

Die Zugabe von jeweils 40 mM Glutamat oder Succinat als organische Säuren hatte weder unter aeroben noch unter fermentativen Bedingungen einen Einfluss auf die *alsS-lacZ* Expression (Daten nicht gezeigt). Daher kann nicht jede beliebige organische Säure als Effektor von AlsR in Frage kommen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Glutamat und Succinat im Gegensatz zu Acetat und Lactat keine Produkte des fermentativen Stoffwechsels von *B. subtilis* sind. Die Zugabe von 40 mM Acetoin bzw. 40 mM Butandiol als neutrale Produkte der Fermentation, während der die *alsSD* Expression induziert ist, führten ebenfalls weder unter aeroben noch unter fermentativen Wachstumsbedingungen zu einer signifikanten Änderung der *alsS-lacZ* Expression (Daten nicht gezeigt).

Die Synthese von Acetoin anstelle einer weiteren Produktion organischer Säuren wie z.B. Acetat könnte für *B. subtilis* eine Möglichkeit darstellen, den cytoplasmatischen pH-Wert der Zellen konstant zu halten (Holtzclaw and Chapman, 1975). Auch die weitere Reduktion von Acetoin zu Butandiol beeinflusst den cytoplasmatischen pH-Wert von *B. subtilis* nicht. Beide Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Expression von *alsS-lacZ*. Dies ist schlüssig, da für *B. subtilis* in Anwesenheit dieser Substanzen keine Notwendigkeit besteht, vermehrt neutrale Fermentationsprodukte zu synthetisieren. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Acetoin und Butandiol unter den gewählten Kultivierungsbedingungen mit einem Überschuss an Glukose von den Zellen nicht aufgenommen werden, und daher keinen Einfluss auf die Expression von *alsS-lacZ* haben.

Anhand dieser Ergebnisse könnte sowohl Acetat als auch Lactat als Effektor von AlsR in Frage kommen. Es wäre auch möglich, dass AlsR nicht nur durch einen einzigen Effektor aktiviert werden kann, sondern dass sowohl Acetat als auch Lactat Effektoren von AlsR sein könnten.

Eine zusätzliche Möglichkeit, Acetat als potentiellen Effektor von AlsR mit Hilfe einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion zu testen, war die Bestimmung der zugehörigen β -Galaktosidaseaktivität in einem *B. subtilis* Stamm, der kein Acetat produzieren kann. Dazu wurde genomische DNA des *B. subtilis* Stamms 42 (Tab. 4), dessen *pta* Gen durch eine Spectinomycin-Kassette unterbrochen war, isoliert. Das Gen *pta* kodiert für die Phosphotransacetylase (Pta), welche Acetyl-CoA zu Acetylphosphat umsetzt (Abb. 2). Acetylphosphat wird durch die Acetatskinase zu Acetat umgewandelt. Durch die Mutation des *pta* Gens kann *B. subtilis* über diesen Syntheseweg kein Acetat mehr produzieren. Mit der isolierten genomischen DNA aus Stamm 42 wurde der Stamm HRB7 transformiert, der eine *alsS-lacZ* Reporterengenfusion im *amyE*-Locus besitzt. Daraus entstand der Stamm AMBs17.

Wenn Acetat der Effektor von AlsR ist, sollte die Expression des *alsSD* Operons in einer *pta* Mutante im Vergleich zur Expression in einem WT-Stamm reduziert sein. Um dies zu untersuchen, wurde die β -Galaktosidaseaktivität der *B. subtilis* Stämme HRB7 (Wildtyp, Tab. 4) und AMBs17 (*pta* Mutante, Tab. 4) unter fermentativen sowie fermentativen Wachstumsbedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Unter fermentativen Bedingungen war die β -Galaktosidaseaktivität der *pta* Mutante mit 411 Miller-Units im Vergleich zu der des Wildtyps um 33,3 % reduziert (Tab. 13). Die Zugabe von 40 mM Acetat unter fermentativen Bedingungen resultierte in der *pta* Mutante und im Wildtyp in einer vergleichbaren β -Galaktosidaseaktivität (Tab. 13).

Tab. 13 Die Expression von *alsS-lacZ* in einem *Bacillus subtilis* Stamm ohne bzw. mit Mutation im *pta* Gen. Die *Bacillus subtilis* Stämme HRB7 und AMBs17 wurden unter fermentativen sowie fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat in SMM-Medium kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Die relevanten Genotypen der Stämme sind in Klammern angegeben. Die Daten repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standard-abweichung ist angegeben.

Wachstumsbedingung	β -Galaktosidaseaktivität [Miller-Units]	
	HRB7 (<i>amyE::-341alsS-lacZ</i>)	AMBs17 (<i>Δpta;amyE::-341alsS-lacZ</i>)
fermentativ	625 \pm 119	411 \pm 164
fermentativ + 40 mM Acetat	1144 \pm 186	1066 \pm 252

Ein Fehlen der *Pta* führte unter fermentativen Wachstumsbedingungen zu einer reduzierten Expression der *alsS-lacZ* Reportergenfusion. Diese reduzierte β -Galaktosidaseaktivität könnte ein Hinweis darauf sein, dass Acetat der Effektor von AlsR ist. Hierfür spricht auch, dass die β -Galaktosidaseaktivität in der *pta* Mutante durch Zugabe von 40 mM Acetat zum Medium mit der des Wildtyps vergleichbar war. Allerdings führte das mutierte *pta* Gen unter fermentativen Wachstumsbedingungen nicht zu einem kompletten Verlust der *alsS-lacZ* Expression (Tab. 13). HPLC-Messungen haben gezeigt, dass der Kulturüberstand einer *B. subtilis pta* Mutante immer noch Acetat enthält. Die Acetatmenge betrug hierbei je nach Wachstumsbedingungen 25 bis 50 % der Acetatmenge, die im Kulturüberstand eines *B. subtilis* WT-Stamms gemessen wurde (Presecan-Siedel *et al.*, 1999). Daher muss *B. subtilis* einen weiteren Weg für die Synthese von Acetat besitzen, welcher allerdings bislang unbekannt ist. Sollte Acetat der Effektor von AlsR sein, könnte ein zweiter Weg zur Acetatsynthese die verbleibende Expression der *alsS-lacZ* Reportergenfusion erklären. Erst durch Deletion dieses weiteren Wegs würde es zu einem kompletten Verlust der *alsS-lacZ* Expression kommen. Um solche Analysen durchführen zu können, müssten allerdings erst die für den zweiten Acetatsyntheseweg zuständigen Gene identifiziert werden.

4.3.3 Der Einfluss potentieller Effektoren auf die Bindungsfähigkeit von AlsR an den *alsSD* Promotor

Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien soll im Weiteren untersucht werden, ob die potentiellen Effektoren die Bindungsfähigkeit von AlsR beeinflussen. Hierfür wurden erneut Gelretardationsanalysen durchgeführt. Bei diesen wurde Acetat bzw. Lactat in verschiedenen Mengen zu den Gelretardationsansätzen zugegeben. Auch der Einfluss eines verringerten pH-Werts wurde hinsichtlich veränderter Bindungseigenschaften von AlsR untersucht. Für die Gelretardationsanalysen wurde das zuvor beschriebene radioaktiv-markierte, 42 bp lange *alsSD* Promotorfragment verwendet. Das DNA-Fragment wurde zur Kontrolle ohne Zugabe von AlsR (Abb. 33, Spur 1), sowie zur Demonstration eines AlsR/DNA-Komplexes ohne Effektor mit 2,9 pmol AlsR inkubiert (Abb. 33, Spur 2). Für alle weiteren Ansätze wurden ebenfalls 2,9 pmol AlsR verwendet. Es wurden Ansätze mit 1 mM (Abb. 33, Spur 3), 5 mM (Abb. 33, Spur 4), 10 mM (Abb. 33, Spur 5) und 40 mM Acetat (Abb. 33, Spur 6) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 2,9 pmol AlsR zum

radioaktiv-markierten *alsSD* Promotorfragment zu den bereits beobachteten retardierten Banden führte (Abb. 33, Spur 2). Die Zugabe von Acetat führte in keiner der verwendeten Konzentrationen zu einer Veränderung dieser beiden AlsR/DNA-Komplexe (Abb. 33, Spur 3-6). Auch Acetatkonzentrationen bis zu 400 mM führten zu keiner verstärkten Bindung von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentration von mehr als 200 mM Acetat wirkte im Gegenteil sogar inhibierend auf die Bindungsfähigkeit von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment (Daten nicht gezeigt). Dies war auch für die Zugabe von Lactat der Fall, da Lactatkonzentrationen bis zu 100 mM zu keiner Veränderung der Bindungseigenschaften von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment führten (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde untersucht, ob die Verringerung des pH-Werts die Bindung von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment beeinflusst. Dazu wurde das DNA-Fragment in Reaktionspuffer mit einem auf pH 6 reduzierten pH-Wert ohne AlsR (Abb. 33, Spur 7) und mit 2,9 pmol AlsR (Abb. 33, Spur 8) inkubiert. Im Vergleich zu den AlsR/DNA-Komplexen, die bei pH 7,5 gebildet wurden (Abb. 33, Spur 2), führte die Verringerung des pH-Werts zu keiner signifikanten Veränderung in den Bindungseigenschaften von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment (Abb. 33, Spur 8).

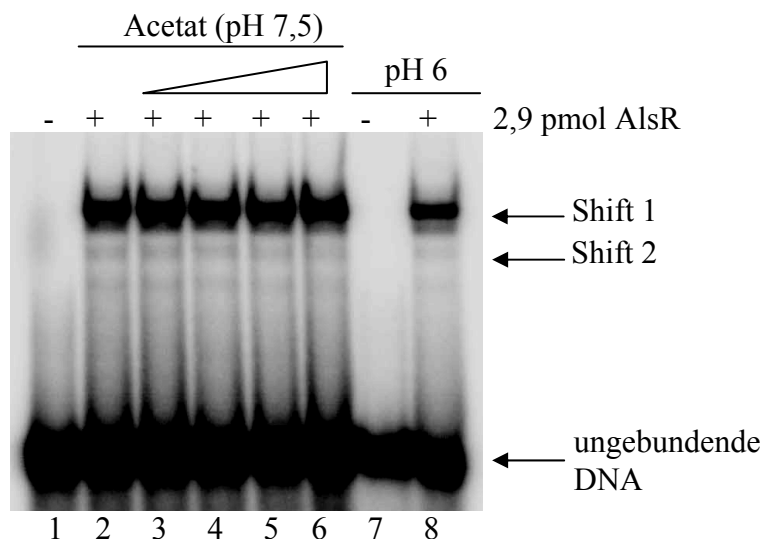


Abb. 33 Der Einfluss von Acetat und pH-Wert auf Gelretardationsanalysen eines *alsSD* Promotorfragments mit AlsR. Dargestellt ist ein 42 bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors repräsentiert. Es wurden jeweils 0,1 pmol radioaktiv-markierte DNA und 2,9 pmol AlsR eingesetzt. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). Für einen AlsR/DNA-Komplex ohne Effektor wurden 2,9 pmol AlsR eingesetzt (Spur 2). Weiterhin wurden 1 mM (Spur 3), 5 mM (Spur 4), 10 mM (Spur 5) und 40 mM (Spur 6) Acetat hinzugefügt bzw. der pH-Wert reduziert (Spur 7 und 8). Das DNA-Fragment wurde sowohl ohne (Spur 7) als auch mit 2,9 pmol AlsR (Spur 8) bei pH 6,0 inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde getrocknet, 4 h auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaserscanner visualisiert. Die Zugabe von Acetat oder die Reduktion des pH-Werts führten zu keiner Veränderung der Bindungsfähigkeit von AlsR.

Weder Acetat, Lactat noch ein verringerter pH-Wert bewirkten als Einzelfaktoren eine Veränderung in den Bindungseigenschaften von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment. Um die Möglichkeit zu testen, ob Acetat und ein verringerter pH-Wert in Kombination einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von AlsR haben, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt, bei denen beide Faktoren kombiniert wurden. Als Kontrolle wurde das 42 bp lange *alsSD* Promotorfragment ohne AlsR inkubiert (Abb. 34, Spur 1). Zum Vergleich wurde das DNA-Fragment mit 2,9 pmol AlsR in Reaktionspuffer mit einem pH-Wert von 7,5 inkubiert (Abb. 34, Spur 2). Zusätzlich erfolgte eine Inkubation der DNA mit AlsR in Reaktionspuffer mit einem pH-Wert von 6 ohne die Zugabe von Acetat (Abb. 34, Spur 3). Die AlsR/DNA-Komplexe bei pH 7,5 und pH 6 waren vergleichbar (Abb. 34, Spur 2 und 3). Der verringerte pH-Wert in Kombination mit 1 mM (Abb. 34, Spur 4), 5 mM (Abb. 34, Spur 5), 10 mM (Abb. 34, Spur 5) bzw. 40 mM Acetat (Abb. 34, Spur 7) führte zu keiner Veränderung dieser AlsR/DNA-Komplexe (Abb. 34, Spur 4-7).

Die Kombination verschiedener Lactatmengen (bis zu 40 mM) mit einem verringerten pH-Wert (pH 6) führte ebenfalls nicht zu einer verstärkten Bindungsfähigkeit von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment. Im Gegenteil führten bereits 5 mM Lactat in Kombination mit pH 6 zu einer verringerten Bindungsfähigkeit von AlsR an das Promotorfragment (Daten nicht gezeigt).

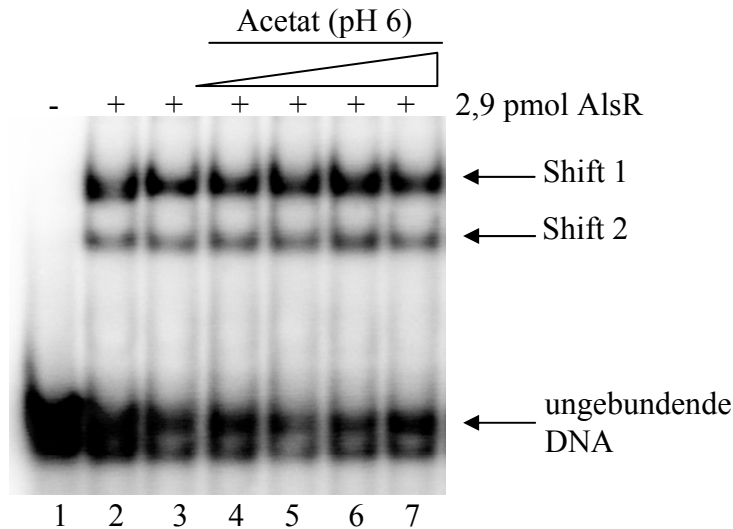


Abb. 34 Der Einfluss einer Kombination von Acetat und reduziertem pH-Wert auf Gelretardationsanalysen eines *alsSD* Promotorfragments mit AlsR. Dargestellt ist ein 42 bp langes, radioaktiv-markiertes DNA-Fragment, welches Position -89 bis -48 des *alsSD* Promotors repräsentiert. Es wurden jeweils 0,1 pmol radioaktiv markierte DNA und 2,9 pmol AlsR eingesetzt. Als Standard für ungebundene DNA wurde eine Reaktion ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). Zur Demonstration von AlsR/DNA-Komplexen bei unverändertem pH-Wert wurde ein Ansatz bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt (Spur 2). Zur Demonstration von AlsR/DNA-Komplexen bei einem verringerten pH-Wert ohne Effektor wurde ein Ansatz bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt (Spur 3). Zusätzlich wurde der reduzierte pH-Wert des Reaktionspuffers mit der Zugabe von 1 mM (Spur 4), 5 mM (Spur 5), 10 mM (Spur 6) und 40 mM (Spur 7) Acetat kombiniert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer getrennt. Das Gel wurde getrocknet, 4 h auf einen Phosphor-Screen aufgelegt und mit einem Fluoreszenzlaserscanner visualisiert. Die Kombination von Acetat mit reduziertem pH-Wert führte zu keiner Veränderung der AlsR/DNA-Komplexe (Spur 4-7).

Auch die Kombination von Acetat bzw. Lactat und verringertem pH-Wert führte zu keiner veränderten Bindungseigenschaft von AlsR an das *alsSD* Promotorfragment.

LTTRs können im Promotor ihres Zielgens an zwei Bindestellen binden, die RBS im Bereich -65 und die ABS im Bereich -35 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Gens. Einem Modell zufolge bindet ein LTTR-Dimer effektorunabhängig an die RBS, gefolgt von einer effektorabhängigen Bindung eines zweiten Dimers. Durch eine hieraus resultierende Konformationsänderung kann das zweite Dimer mit der ABS interagieren und die Transkription des Zielgens aktivieren (McFall *et al.*, 1998). Das für die Gelretardationsanalysen verwendete DNA-Fragment entsprach dem *alsSD* Promotor von Position -86 -48 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt. Somit war eine potentielle ABS in diesem Fragment nicht enthalten. An Position -35 im *alsSD* Promotor in Relation zum Transkriptionsstartpunkt befindet sich im Gegensatz zu Position -67 keine AlsR-Box. Jedoch ist an Position -41 bis -29 (zentrale Position -35) eine Sequenz mit der Basenabfolge T-N₁₁-A lokalisiert, die der minimalen Konsensussequenz von LTTR-Regulatoren entspricht (Schell, 1993). Diese Bindestelle könnte eine ABS darstellen. Gelretardationsanalysen sowie

auch DNaseI-Protektionsanalysen in An- und Abwesenheit potentieller Effektoren mit einem *alsSD* Promotorfragment, das sowohl die RBS als auch die ABS beinhaltet, könnten im Gegensatz zu den verwendeten Promotorfragmenten eine effektorabhängige Bindung zeigen.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass der Effektor nicht die Bindung von AlsR an den Promotor reguliert, sondern die Transaktivierung der Transkription des *alsSD* Operons in Kombination mit der RNA-Polymerase (RNAP). Um dies zu überprüfen, wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen eines *alsSD* Promotorfragments mit gereinigtem AlsR und gereinigter *B. subtilis* RNAP durchgeführt.

4.3.4 Der Einfluss potentieller Effektoren auf die Fähigkeit von AlsR zur Transaktivierung der *alsSD* Operon Transkription

Für *in vitro* Transkriptionsanalysen wurde mit Hilfe der PCR ein Promotorfragment hergestellt, das dem *alsSD* Promotorbereich von Position -116 bis +105 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Operons entspricht. Nach erfolgreicher Transkription wird daher ein Transkript mit einer Länge von 105 nt erwartet. Die für die *in vitro* Transkription benötigte RNAP wurde im *B. subtilis* Stamm MH5636 (Tab. 4) produziert, bei welchem die β' -Untereinheit der RNAP mit einem His₁₀-Tag zur Affinitäts-Chromatographie fusioniert war (Qi and Hulett, 1998). Die weiteren Untereinheiten der RNAP konnten durch Bindung an die β' -Untereinheit co-gereinigt werden. Die Reinigung der RNAP erfolgte über eine Ni²⁺-NTA-Tropfsäule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und wurde per SDS-PAGE verfolgt. Die *B. subtilis* RNAP konnte erfolgreich gereinigt werden (Abb. 35). Durch die His₁₀-getaggte β' -Untereinheit erfolgte eine Co-Reinigung der β -, σ -, α -, und δ -Untereinheiten (Abb. 35, Spur 4). Aus 2 Litern MH5636-Kultur konnten durchschnittlich ca. 2 mg RNAP gereinigt werden.

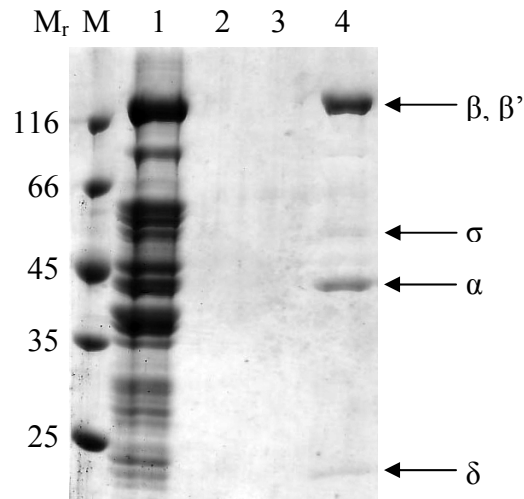


Abb. 35 Die gereinigte RNA-Polymerase aus *Bacillus subtilis*. Dargestellt ist der Durchfluss der löslichen Fraktion lysierter *B. subtilis* MH5636 Zellen nach Passage einer Ni^{2+} -NTA-Tropfsäule (Spur 1), eine Waschfraktion (Spur 2), eine Prä-Elutionsfraktion (Spur 3) sowie eine Elutionsfraktion (Spur 4). Die Reinigung der RNAP erfolgte über eine Ni^{2+} -NTA-Tropfsäule mit einem Säulenvolumen von 2 ml. Die RNAP wurde erfolgreich gereinigt, ihre Untereinheiten sind durch Pfeile markiert. Das Volumen der RNAP-produzierenden *B. subtilis* Kultur betrug 2 Liter. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1.000). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 13,2%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Nach erfolgter Reinigung der RNAP aus *B. subtilis* konnten *in vitro* Transkriptionsanalysen durchgeführt werden. Die Zugabe von $1,0 \mu\text{M}$ AlsR führte zur Synthese des erwarteten, spezifischen Transkripts mit einer Länge von 105 nt (Abb. 36 A-C, Spur 2). Die Menge dieses Transkripts konnte durch Zugabe der steigenden Acetatmengen $0,1 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 3), $0,25 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 4), $0,5 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 5), $1,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 6), $2,5 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 7), $5,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 8), $10,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 9), $50,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 10) und 100 mM (Abb. 36 A, Spur 11) nicht signifikant gesteigert werden. Die Zugabe von 50 mM Acetat führte dabei zu einer reduzierten Transkriptmenge (Abb. 36 A, Spur 10), die Zugabe von 100 mM Acetat resultierte in einem kompletten Verlust der Transkriptsynthese (Abb. 36 A, Spur 11). Acetat hatte also keinen Einfluss auf die AlsR-abhängige *alsS in vitro* Transkription.

Die Zugabe von Lactat in den steigenden Mengen $0,1 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 3), $0,25 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 4), $0,5 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 5), $1,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 6), $2,5 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 7), $5,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 8), $10,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 9), $50,0 \text{ mM}$ (Abb. 36 A, Spur 10) und 100 mM (Abb. 36 A, Spur 11) resultierte in keiner verstärkten Synthese des spezifischen 105 nt langen Transkripts (Abb. 36 B, Spur 3-11). Die Zugabe von 50 und 100 mM Lactat führten jeweils zu

einem kompletten Verlust jeglicher Transkriptsynthese (Abb. 36 B, Spur 10 und 11). Somit beeinflusst Lactat die AlsR-abhängige *in vitro* Transkription von *alsS* nicht.

Die Zugabe der steigenden Acetoinmengen 0,1 mM (Abb. 36 C, Spur 3), 0,25 mM (Abb. 36 C, Spur 4), 0,5 mM (Abb. 36 C, Spur 5), 1,0 mM (Abb. 36 C, Spur 6), 2,5 mM (Abb. 36 C, Spur 7), 5,0 mM (Abb. 36 C, Spur 8), 10,0 mM (Abb. 36 C, Spur 9), 50,0 mM (Abb. 36 C, Spur 10) und 100,0 mM (Abb. 36 C, Spur 11) führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung in der Menge des 105 nt langen Transkripts (Abb. 36 C, Spur 3-11). Auch Acetoin hatte also keinen Einfluss auf die AlsR-abhängige *in vitro* Transkription von *alsS*.

Die Zugabe von 100 mM Acetat (Abb. 36, Spur 11) und von 50 und 100 mM Lactat führte zu einem kompletten Verlust der Synthese des spezifischen 105 nt langen Transkripts (Abb. 36A, Spur 11; Abb. 37B, Spur 10 und 11). Dies könnte bedeuten, dass derartige Konzentrationen organischer Säuren die Funktion der gereinigten RNAP beeinträchtigen bzw. inhibieren. Die Mengen des spezifischen 105 nt langen Transkripts nach Zugabe von 0,5 bzw 1,0 mM Acetat (Abb. 36A, Spur 5 und 6) erschienen im Vergleich zum Ansatz ohne Acetat (Abb. 36A, Spur 2) um einen Faktor von ca. 1,5 erhöht. Dies war auch der Fall für die Menge dieses Transkripts nach Zugabe von z.B. 0,1 mM oder 0,25 mM Lactat (Abb. 36B, Spur 3 und 4) verglichen mit der Menge ohne Lactat (Abb. 36B, Spur 2). Auch nach der Zugabe von 50 mM Acetoin (Abb. 36C, Spur 10) erschien die Menge des 105 nt langen Transkripts ca. zweifach höher als ohne Acetoin (Abb. 36C, Spur 2). In all diesen Fällen war jedoch auch das Hintergrundrauschen erhöht. Dies könnte bedeuten, dass eventuell das Auftragsvolumen nicht in jedem Fall identisch war. Zusammenfassend zeigte weder Acetat, Lactat noch Acetoin eine Verstärkung der AlsR-abhängigen *in vitro alsS* Transkriptsynthese.

Neben dem spezifischen *alsS* Transkript von 105 nt Länge wurde allein durch Zugabe von RNAP zwei weitere RNA-Fragmente von 55 und 65 nt Länge *in vitro* synthetisiert (Abb. 36 A-C, Spur 1). Die Zugabe von AlsR verringerte die Menge des 65 nt langen Transkripts um ca. 50 % (Abb. 36 A-C, Spur 2-11). Dies deutet auf eine AlsR-abhängige Repression hin, wie sie bereits für andere LTTRs bekannt ist (Schell, 1993). Die eingesetzte DNA-Matrize entspricht einem *alsSD* Promotorfragment von Position -113 bis +105 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Operons. Da das *alsR* Gen divergent vom *alsSD* Operon transkribiert wird, über-

lappen die Promotorbereiche des *alsR* Gens und des *alsSD* Operons. Die 55 und 65 nt langen RNA-Fragmente könnten daher *alsR* Transkripten entsprechen.

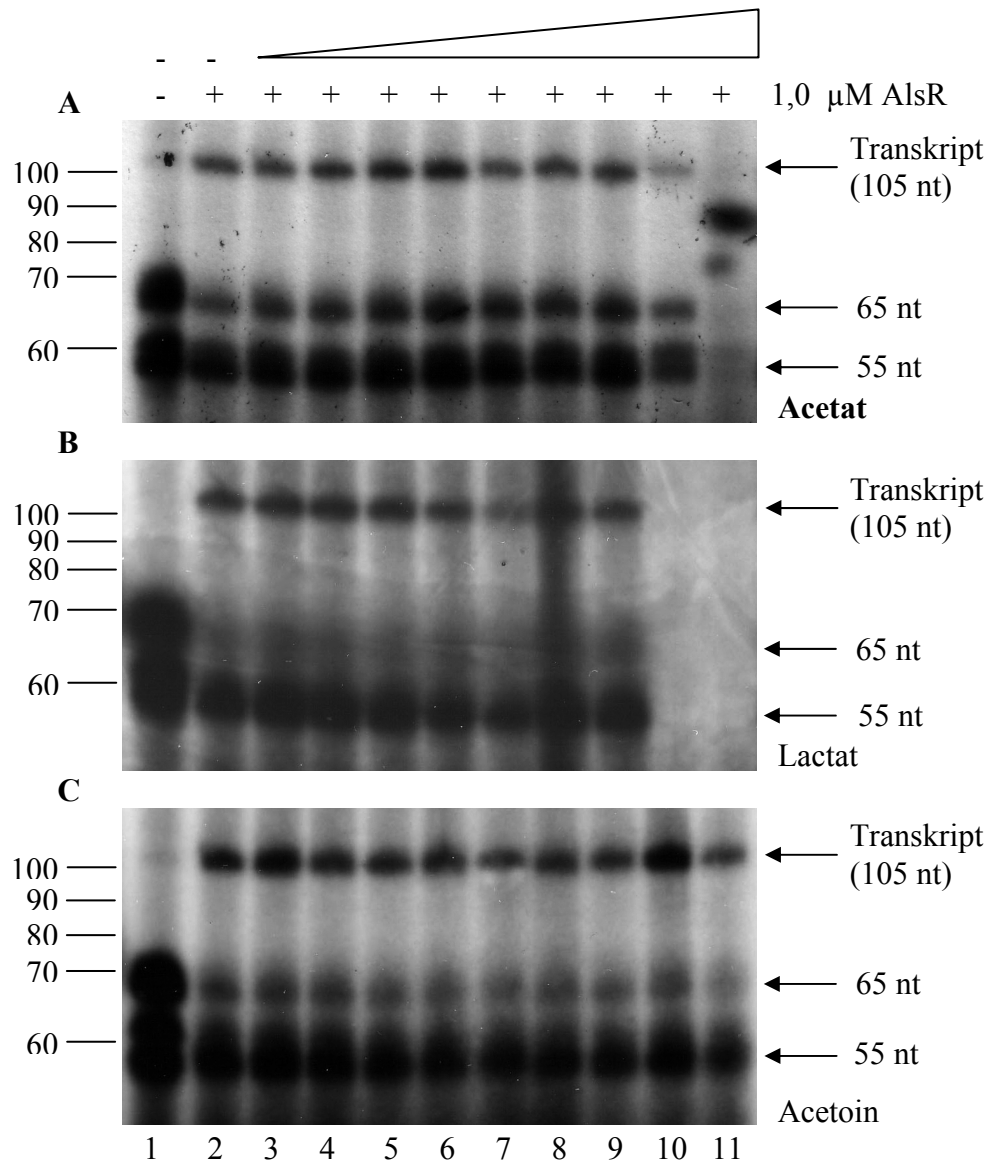


Abb. 36 *In vitro*-Transkriptionsanalysen eines *alsSD* Promotorfragments mit Zugabe von Acetat (A), Lactat (B) oder Acetoin (C) als potentielltem Effektor von AlsR. Dargestellt ist das Transkript eines DNA-Templats, welches Position -116 bis +105 im *alsSD* Promotor repräsentiert. Es wurden jeweils 0,08 pmol DNA mit 10 pmol AlsR für 20 min bei RT inkubiert und anschließend die Transkription durch Zugabe von 0,25 pmol *B. subtilis* RNAP gestartet. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). Es wurden jeweils 0,08 pmol DNA mit 10 pmol AlsR und 0,25 pmol RNAP ohne Zugabe des potentiellen Effektors (Spur 2) sowie mit 0,1 mM (Spur 3), 0,25 mM (Spur 4), 0,5 mM (Spur 5), 1,0 mM (Spur 6), 2,5 mM (Spur 7), 5,0 mM (Spur 8), 10,0 mM (Spur 9), 50,0 (Spur 10) und 100,0 mM (Spur 11) potentielltem Effektor inkubiert. Die steigenden Mengen der potentiellen Effektoren sind durch ein ansteigendes Dreieck dargestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel in 1,0 x TBE-Puffer getrennt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms wurde das Gel für 24-96 Stunden bei -80 °C inkubiert. Ohne Zugabe von AlsR ist bei einer Größe von 105 nt keine Bande erkennbar. Die Zugabe von AlsR führt zur Synthese eines spezifischen Transkripts mit einer Länge von 105 nt (markiert durch einen Pfeil).

Da der Einfluss des externen pH-Werts als Effektor von AlsR nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden zusätzlich zu den durchgeführten *in vitro* Transkriptionsanalysen, bei denen Fermentationsprodukte von *B. subtilis* als mögliche Effektoren von AlsR untersucht wurden, Analysen mit einem verringerten pH-Wert durchgeführt. Hierfür wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen durchgeführt, bei denen der pH-Wert des Reaktionspuffers von 7,5 auf 6 verringert wurde. Diese Reduktion des pH-Werts führte nicht zu einer Änderung in der Menge des spezifischen 105 nt langen *alsS* Transkripts (Abb. 37, Spur 2 und 3). Bei Gelretardationsexperimenten zeigte die Kombination von Acetat bzw. Lactat mit einem verringerten pH-Wert keinen Effekt auf die Bindungsfähigkeit von AlsR an den *alsSD* Promotor. Nun sollte untersucht werden, ob durch eine solche Kombination eine veränderte Transaktivierung der *alsSD* Transkription durch AlsR erfolgt. Die Kombination von pH 6 mit 1,0 mM (Abb. 37, Spur 4), 5,0 mM (Abb. 37, Spur 5), 10,0 mM (Abb. 37, Spur 6) oder 50,0 mM (Abb. 37, Spur 7) Acetat führte zu keiner veränderten Menge des 105 nt langen Transkripts verglichen mit Reaktionsbedingungen bei pH 7,5 ohne potentiellen Effektor (Abb. 37, Spur 2). Auch die Zugabe entsprechender Mengen Lactat führte zu keiner Veränderung in der Menge des 105 nt langen *alsS* Transkripts (Abb. 37, Spur 8-11). Die Zugabe von 50 mM Lactat führte wie bereits zuvor (Abb. 36 B, Spur 10), zu einem Verlust der RNAP-Aktivität (Abb. 37, Spur 11).

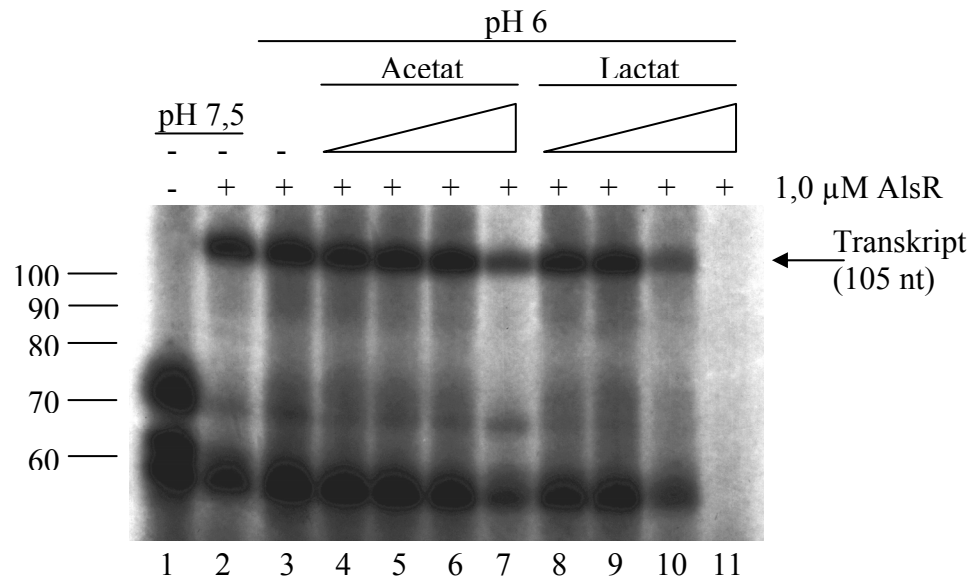


Abb. 37 *In vitro*-Transkriptionsanalysen eines *alsSD* Promotorfragments bei verringertem pH-Wert. Dargestellt ist das Transkript eines DNA-Templats, welches Position -116 bis +105 im *alsSD* Promotor repräsentiert. Es wurden jeweils 0,08 pmol DNA mit 10 pmol AlsR für 20 min bei RT inkubiert und anschließend die Transkription durch Zugabe von 0,25 pmol *B. subtilis* RNAP gestartet. Als Kontrolle auf Aktivität der RNAP wurde ein Ansatz ohne die Zugabe von AlsR durchgeführt (Spur 1). Es wurden jeweils 0,08 pmol DNA mit 10 pmol AlsR und 0,25 pmol RNAP bei pH 7,5 (Spur 2) und pH 6,0 (Spur 3) sowie bei pH 6,0 in Kombination mit 1 mM (Spur 3), 5 mM (Spur 5), 10 mM (Spur 6) und 50 mM Acetat (Spur 7) oder 1 mM (Spur 8), 5 mM (Spur 9), 10 mM (Spur 10) und 50 mM Lactat (Spur 11) inkubiert. Diese steigenden Mengen sind durch ansteigende Dreiecke dargestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze elektrophoretisch in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel in 1,0 x TBE-Puffer getrennt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms wurde das Gel für 24-96 Stunden bei -80 °C inkubiert. Ein verringerter pH-Wert führte weder als Einzelfaktor noch in Kombination mit Acetat oder Lactat zu einer verstärkten Synthese des 105 nt langen Transkripts (markiert durch einen Pfeil).

Da auch die Kombination von reduziertem pH-Wert mit Acetat bzw. Lactat zu keiner signifikant veränderten *in vitro*-Transkription führte, kann keiner der getesteten, potentiellen Effektoren als Effektor von AlsR bestätigt werden. Die Methode müsste dahingehend optimiert werden, dass sich die gebildete Gesamt-Transkriptmenge quantifizieren ließe. So könnten Unterschiede in der Menge des synthetisierten Transkripts unter den verschiedenen Bedingungen genau festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Effektors von AlsR wären Kristallisationsanalysen in An- und Abwesenheit verschiedener potentieller Effektoren.

Eins oder beide der bei den *in vitro* Transkriptionsanalysen entstandenen, 55 und 65 nt langen RNA-Fragmente könnte ein Transkript des *alsR* Gens darstellen. Für *alsR* ist der Transkriptionsstartpunkt bislang nicht bekannt. Um diesen zu bestimmen, und damit zu bestätigen, dass eins oder mehrere der zusätzlich zum spezifischen Transkript synthetisierten RNA-Fragmente *alsR* Transkripte sein könnten, wurden „Primer Extension“-Analysen durchgeführt.

4.4 Regulation der Expression von *alsR* und *alsSD*

4.4.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *alsR*

Um den Transkriptionsstartpunkt von *alsR* zu bestimmen, wurde die Gesamtzell-RNA des *B. subtilis* Stamms JH642 präpariert. Dieser wurde zuvor unter fermentativen Wachstumsbedingungen bis in die exponentielle Phase kultiviert. Die reverse Transkription zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *alsR* wurde mit dem *alsR*-spezifischen Primer AM13 (Tab. 7) initiiert, der zuvor γ - ^{32}P -markiert wurde. Parallel zur reversen Transkription wurden mit dem gleichen Primer Sequenzierungsreaktionen durchgeführt, bei denen das Plasmid *palsR-lacZ* (Tab. 5) als Matrize diente. Im Acrylamidgel war nach erfolgter „Primer Extension“-Analyse eine distinkte Bande erkennbar. Dieser Bande konnte nach Aufschlüsselung der parallel durchgeführten Sequenzierungsreaktionen der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* zugewiesen werden. Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* ist ein Thymidin (Abb. 38).

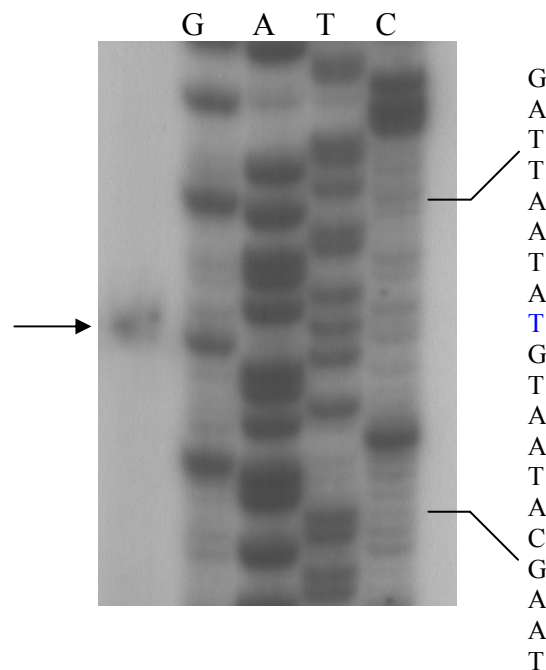


Abb. 38 Der Transkriptionsstartpunkt des *alsR* Gens. Dargestellt ist die „Primer Extension“-Analyse von *alsR*, ausgehend vom *alsR*-spezifischen, radioaktiv-markierten Primer AM13 (Tab. 7). Die Gesamtzell-RNA des Stamms JH642 wurde unter fermentativen Wachstumsbedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase präpariert. Die parallel durchgeführte Sequenzierungsreaktion erfolgte ebenfalls mit dem Primer AM13 sowie dem Plasmid *palsR-lacZ* als Matrize. Nach erfolgter Inkubation wurden die „Primer Extension“-Analyse und die Sequenzierungsreaktionen in einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel in 1,0 x TBE-Puffer separiert. Nach Auflegen eines Röntgenfilms wurde das Gel für 3-7 Tage bei -80 °C inkubiert. Die Sequenzierungsreaktionen sind mit G, A, T und C gekennzeichnet. Die bei der „Primer Extension“-Analyse synthetisierte Bande ist durch einen Pfeil markiert. Der neben der Abbildung aufgeschlüsselte Sequenzbereich enthält den Transkriptionsstartpunkt von *alsR* (die entsprechende Base ist blau markiert).

Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* befindet sich innerhalb der zuvor definierten AlsR-Box im *alsSD* Promotor (Abb. 39 A). LTTRs sind oft stromaufwärts der von ihnen regulierten Gene oder Operons auf dem Gegenstrang der DNA lokalisiert (Schell, 1993). Dadurch überlappen die Promotoren von Regulator und Zielgen teilweise, wie hier bei dem *alsR* Gen und *alsSD* Operon, so dass es parallel zur Aktivierung des *alsS* Gens zu einer negativen Autoregulation des Regulators kommt (Schell, 1993). Dies könnte auch für AlsR zutreffen. Durch Bindung von AlsR an die AlsR-Box an Position -76 bis -58 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons aktiviert AlsR dessen Transkription. Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* befindet sich in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons an Position -63 und liegt somit innerhalb der AlsR-Box. AlsR könnte also durch Bindung an die AlsR-Box und die damit einhergehende Besetzung seines eigenen Transkriptionsstartpunkts die Transkription des *alsR* Gens reprimieren, da der Transkriptionsstartpunkt dann für die RNA-Polymerase unzugänglich wäre.

Der nun ermittelte Transkriptionsstartpunkt von *alsR* sowie die zuvor definierte AlsR-Box im *alsSD* Promotor (Kap. 4.2) wurden in die schematische Darstellung der genomischen Organisation des *alsSD* Operons und *alsR* Gens (Kap. 1.5, Abb. 4) eingefügt (Abb. 39 B).

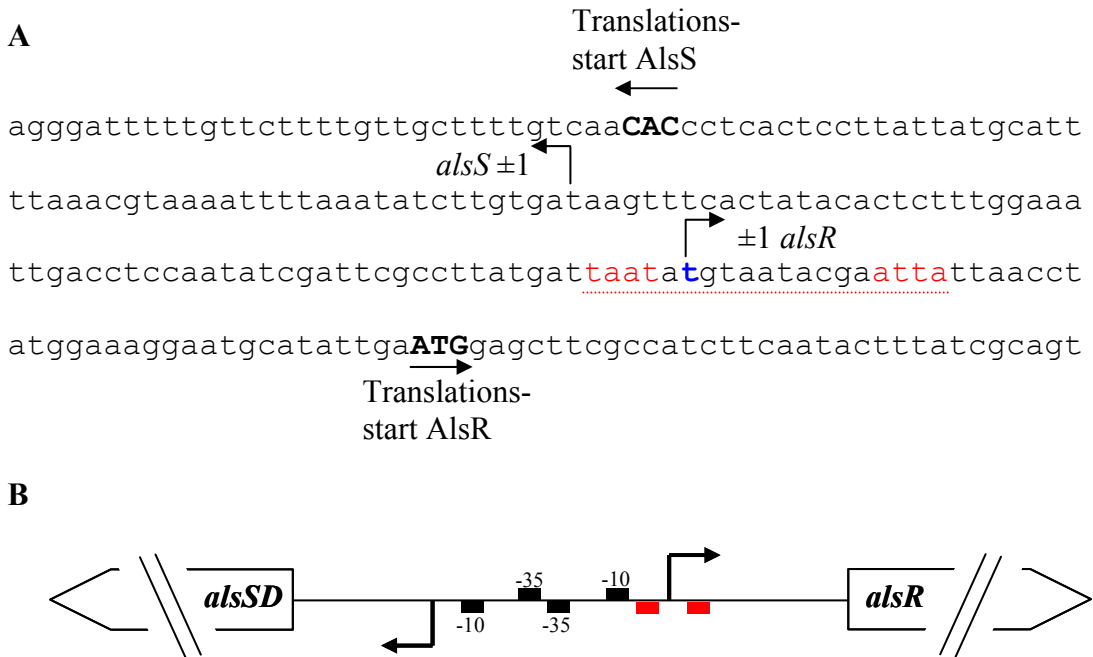


Abb. 39 Die Lokalisation des *alsR* Transkriptionsstartpunkts innerhalb der überlappenden Promotoren von *alsR* und *alsSD* (A) und die erweiterte schematische Darstellung der genomischen Organisation des *alsSD* Operons und des *alsR* Gens (B). (A) Dargestellt sind die überlappenden Promotoren des *alsR* Gens und *alsSD* Operons, wobei der Plus-Strang der DNA dargestellt ist. Die Translationsstartpunkte von AlsS und AlsR sind durch Großbuchstaben, einen geraden Pfeil und entsprechende Beschriftung gekennzeichnet. Die Transkriptionsstartpunkte sind durch einen eckigen Pfeil und die Beschriftung „±1“ gekennzeichnet. Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* ist zusätzlich durch blaue Schrift hervorgehoben. Er befindet sich innerhalb der AlsR-Box, dem Bereich, an den AlsR im *alsSD* Promotor bindet. Die AlsR-Box mit der Sequenz TAAT-N₁₁-ATTA ist durch eine rot gepunktete Linie, der palindromische Teil der AlsR-Box zusätzlich durch rote Schrift hervorgehoben. (B) Das *alsSD* Operon ist auf dem Minus-Strang des *B. subtilis* Chromosoms, das *alsR* Gen auf dem Plus-Strang lokalisiert. Letzteres wird somit divergent zum *alsSD* Operon transkribiert. Die -35- und -10-Regionen des *alsR* Gens und *alsSD* Operons sind angegeben. Die Pfeile geben die Positionen der Transkriptionsstartpunkte an. Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* liegt innerhalb der AlsR-Box (die palindromische Bindesequenz TAAT-N₁₁-ATTA ist durch zwei rote Boxen dargestellt), an die AlsR zur Aktivierung der *alsSD* Expression bindet. Dadurch könnte AlsR die Transkription seines eigenen Gens reprimieren.

Bei den durchgeführten *in vitro* Transkriptionsanalysen (Kap. 4.3.4) wurden zusätzlich zum erwarteten, 105 nt langen *alsS* Transkript weitere RNA-Fragmente mit Größen von etwa 55 und 65 nt synthetisiert (Abb. 36 und 37). Das für die *in vitro* Transkriptionsanalysen als Matrize verwendete DNA-Fragment enthielt den Sequenzbereich von Position -116 bis +105 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons. Zusätzlich enthielt es aufgrund einer Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende neun zusätzliche Basenpaare. Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* befindet sich an Position -63 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons. Daher enthielt die für die *in vitro* Transkriptionsanalysen verwendete DNA-Matrize einen 54 bp langen *alsR* Promotorbereich. Mit den neun zusätz-

lichen Basen am 5'-Ende der DNA-Matrize ist also bei den *in vitro* Transkriptionsanalysen ein *alsR* Transkript mit einer Länge von 63 nt zu erwarten.

Bei allen durchgeführten *in vitro* Transkriptionsanalysen führte die Zugabe von AlsR zu einer um etwa 50 % reduzierten Menge des ca. 65 nt langen RNA-Fragments. Diese Größe stimmt gut der erwarteten *alsR* Transkriptlänge von 63 nt überein. Die Menge des RNA-Fragments mit einer Länge von ca. 55 nt blieb konstant. Die reduzierte Synthese etwa 65 nt langen RNA-Fragments ist in Übereinstimmung damit, dass LTTRs ihre eigene Transkription negativ autoregulieren können (Schell, 1993). Daher könnte das ca. 65 nt lange RNA-Fragment der *in vitro* Transkriptionsanalysen einem spezifischen *alsR* Transkript entsprechen (Abb. 36 A-C, Spur 1). Das 55 nt lange RNA-Fragment ist hingegen nicht erklärbar. Um das etwa 65 nt lange RNA-Fragment als ein spezifisches *alsR* Transkript zu bestätigen, könnten *in vitro* Transkriptionsanalysen mit einer am 5'-Ende verkürzten DNA-Matrize durchgeführt werden. Ist das ca. 65 nt lange RNA-Fragment ein *alsR* Transkript, müsste es in seiner Länge entsprechend verkürzt synthetisiert werden.

4.4.2 Regulation der Expression des *alsR* Gens

Die Expression einer *alsR-lacZ* Reporterengenfusion ist unter fermentativen im Vergleich zu aeroben Bedingungen induziert (March, 2005). Eine weitere Induktion, z.B. durch die Zugabe von Acetat zum Wachstumsmedium oder Verringerung des externen pH-Werts erfolgt nicht, so dass die Stärke einer *alsS-lacZ* Reporterengenfusion nicht direkt von der Stärke der *alsR* Expression abhängt.

Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Expression von *alsR-lacZ* unter aeroben und fermentativen Wachstumsbedingungen unabhängig von ResDE ist (March, 2005). Sowohl in einer *fnr*-Mutante als auch in einer *alsR*-Mutante war die Expression von *alsR-lacZ* unter fermentativen Wachstumsbedingungen verglichen mit dem Wildtyp jeweils etwa um den Faktor 2 erhöht (March, 2005).

In *B. subtilis* spielt neben ResDE und Fnr der Regulator Rex ebenfalls eine Rolle in der Regulation des anaeroben Stoffwechsels. Unter aeroben Bedingungen und während der Nitratatmung wird NADH über die Elektronentransportkette oxidiert, und es liegt mehr NAD^+ als NADH in der Zelle vor. Unter diesen Bedingungen ist Rex als Repressor aktiv und reprimiert z.B. die Expression des *ldh-lctP* Operons, das für die Lactatdehydrogenase und -permease kodiert, des *cydABCD* Operons, das für die respiratorische Oxidase Cytochrom bd kodiert oder des Gens *ywcJ*, das für einen

potentiellen Nitrittransporter kodiert (Wang *et al.*, 2008). Unter Bedingungen mit hohem NADH-Level, also unter anaeroben Bedingungen, dissoziiert Rex von den Promotoren seiner Zielgene und ermöglicht so deren Transkription (Wang *et al.*, 2008). Die Rex-Bindestelle in den Promotoren des *ldh-lctP* Operons, des *cydABCD* Operons und des Gens *ywcJ* wurden durch DNaseI-Protektionsanalysen bestimmt (Larsson *et al.*, 2005; Schau *et al.*, 2004). Die Erkennungssequenz von Rex hat die Basenabfolge 5'-TTGTGAA-N₄-TTCACAA-3' (Larsson *et al.*, 2005). Diese Sequenz überlappt mit einer Fnr-Bindestelle, deren Konsensussequenz 5'-TGTGA-N₆-TCACA-3' ist (Cruz Ramos *et al.*, 1995).

Im *alsR* Promotor befindet sich an Position -69 bis -52 (zentrale Position -60,5) in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt von *alsR* eine potentielle Rex-Bindestelle mit der Sequenz 5'-TTGTGAT-N₄-TTCACTA-3'. Die in dieser Sequenz unterstrichenen Bereiche überlappen mit einem Basenaustausch mit einer Fnr-Erkennungssequenz, die sich ebenfalls an Position -60,5 im *alsR* Promotor in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Gens befindet. Die potentielle Rex-Bindestelle im *alsR* Promotor weicht in zwei Basen von der Rex-Konsensussequenz ab. Durch DNA-Bindungsstudien wurde *in vitro* gezeigt, dass diese Abweichungen die Rex-Bindestelle inaktivieren (Wang *et al.*, 2008).

Um den Einfluss von Rex auf die Expression von *alsR* zu untersuchen, wurde die β -Galaktosidaseaktivität einer *alsR-lacZ* Reporterengenfusion in den *B. subtilis* Stämmen AMBs1 (WT; Tab. 4) und AMBs24 (Δrex ; Tab. 4) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt (Tab. 14). Weder unter aeroben, fermentativen noch anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat unterschied sich die *alsR-lacZ* Expression in der *rex*-Mutante signifikant von der im Wildtyp (Tab. 14). Unter aeroben Wachstumsbedingungen betrug die β -Galaktosidaseaktivität im WT 26, in der *rex*-Mutante 38 Miller-Units (Tab. 14). Unter fermentativen Wachstumsbedingungen zeigte der WT eine β -Galaktosidaseaktivität von 122 Miller-Units, in der *rex*-Mutante waren es 111 Miller-Units (Tab. 14). Auch unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM Nitrat unterschied sich die β -Galaktosidaseaktivität im WT mit 117 Miller-Units nicht signifikant von der in der *rex*-Mutante mit 114 Miller-Units (Tab. 14).

Tab. 14 Die Expression von *alsR-lacZ* im WT und einer *rex*-Mutante. Die *B. subtilis* Stämme AMBs1 und AMBs24 wurden unter aeroben, fermentativen sowie unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat in SMM-Medium kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der relevante Genotyp der Stämme ist jeweils in Klammern angegeben. Die Daten repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben. Die *alsR-lacZ* Expression im WT und in der *rex*-Mutante unterscheidet sich nicht signifikant.

Wachstumsbedingung	β -Galaktosidaseaktivität [Miller-Units]	
	AMBs1 (<i>amyE::alsR-lacZ</i>)	AMBs24 (Δ <i>rex</i> ; <i>amyE::alsR-lacZ</i>)
aerob	26 \pm 3	38 \pm 9
fermentativ	122 \pm 38	111 \pm 17
anaerob + 10 mM Nitrat	117 \pm 23	114 \pm 10

Unter allen getesteten Wachstumsbedingungen war die *alsR-lacZ* Expression im WT und in der *rex*-Mutante vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Regulator Rex keinen Einfluss auf die Expression einer *alsR-lacZ* Reporterfusion hat. Die potentielle Rex-Bindestelle an Position -60,5 im *alsR* Promotor ist daher nicht von Bedeutung für die Expression von *alsR-lacZ*. Dies bedeutet, dass die fermentative Induktion der *alsR-lacZ* Expression nicht durch eine von Rex vermittelte Derepression erfolgt.

4.4.3 Rex-abhängige Regulation der *alsS-lacZ* Expression

Durch die überlappende Organisation der Promotoren des *alsR* Gens und *alsSD* Operons besteht die Möglichkeit, dass die potentielle Rex-Bindestelle einen Einfluss auf die Expression des *alsSD* Operons haben könnte. Dies sollte durch *alsS-lacZ* Reporterfusionen in einem *B. subtilis* WT Stamm sowie einer *rex*-Mutante untersucht werden.

Die Expression einer *alsS-lacZ* Reporterfusion ist unter aeroben Wachstumsbedingungen sehr gering, während sie unter fermentativen Wachstumsbedingungen induziert ist. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat ist die Expression von *alsS-lacZ* im Vergleich zu fermentativen Wachstumsbedingungen um etwa die Hälfte reprimiert. Dieser Effekt wird als Nitratrepression bezeichnet (Cruz Ramos *et al.*, 2000; Reents *et al.*, 2006b).

Im *alsSD* Promotor befinden sich zusätzlich zur AlsR-Box sowohl eine potentielle Rex-Bindestelle als auch eine potentielle Fnr-Bindestelle. Die potentielle Rex-Bindestelle weicht in zwei Basen, die potentielle Fnr-Bindestelle in einer Base von der zugehörigen Konsensussequenz ab. Diese beiden Bindestellen überlappen und befinden sich jeweils an Position -2,5 in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des

alsSD Operons. Diese Position deutet auf eine repressorische Bindestelle hin. Durch Microarray-Analysen sowie *alsS-lacZ* Reporterfusionen wurde gezeigt, dass Fnr *in vivo* keine Rolle bei der anaeroben Induktion der *alsSD* Expression spielt (Reents *et al.*, 2006b). Jedoch bewirkte die Mutation des *fnr* Gens die Aufhebung der Nitratrepression von *alsS-lacZ*, was als indirekter Effekt postuliert wurde (Reents *et al.*, 2006b). Auch unter aeroben Bedingungen war die *alsS-lacZ* Expression in einer *fnr*-Mutante verglichen mit dem Wildtyp um ca. 50 % erhöht (Reents *et al.*, 2006b). Die potentielle Rex-Bindestelle, die mit der potentiellen Fnr-Bindestelle im *alsSD* bzw. *alsR* Promotor überlappt, hatte keinen Einfluss auf die Expression von *alsR-lacZ* (Kap. 4.4.2). In Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des *alsSD* Operons befindet sich die potentielle Rex-Bindestelle mit der Sequenz 5'-TAGTGAA-N₄-ATCACAA an Position -11 bis +7 (zentrale Position -2,5).

Um zu untersuchen, ob Rex einen Einfluss auf die Expression des *alsSD* Operons hat, wurde die β -Galaktosidaseaktivität einer *alsS-lacZ* Reporterfusion in den *B. subtilis* Stämmen HRB7 (WT) und AMBs25 (Δ *rex*) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt (Tab. 15). Unter aeroben Wachstumsbedingungen zeigte der WT eine β -Galaktosidaseaktivität von 31, die *rex*-Mutante eine β -Galaktosidaseaktivität von 79 Miller-Units (Tab. 15). In der *rex*-Mutante war die *alsS-lacZ* Expression im Vergleich zum WT also um den Faktor 2,5 dereprimiert. Unter fermentativen Wachstumsbedingungen zeigten der WT mit 539 und die *rex*-Mutante mit 514 Miller-Units eine vergleichbare β -Galaktosidaseaktivität (Tab. 15). Unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat zeigte der WT mit 273 Miller-Units im Vergleich zu 539 Miller-Units unter fermentativen Wachstumsbedingungen eine deutliche Nitratrepression (Tab. 15). In einer *rex*-Mutante war mit 535 Miller-Units unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat im Vergleich zu 514 Miller-Units unter fermentativen Wachstumsbedingungen keine Nitratrepression zu beobachten (Tab. 15).

Tab. 15 Die Expression von *alsS-lacZ* im WT und einer *rex*-Mutante. Die *B. subtilis* Stämme HRB7 und AMBs25 wurden unter aeroben und fermentativen, sowie unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat in SMM-Medium kultiviert und die β -Galaktosidaseaktivität in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der relevante Genotyp der Stämme ist jeweils in Klammern angegeben. Die Daten repräsentieren Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung ist angegeben. Sowohl unter aeroben Wachstumsbedingungen als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat zeigt die *rex*-Mutante eine ca. zweifache Derepression der *alsS-lacZ* Expression.

Wachstumsbedingung	β -Galaktosidaseaktivität [Miller-Units]	
	HRB7 (<i>amyE::-341alsS-lacZ</i>)	AMBs25 (Δ <i>rex</i> ; <i>amyE::-341alsS-lacZ</i>)
aerob	31 \pm 5	79 \pm 29
fermentativ	539 \pm 72	514 \pm 92
anaerob + 10 mM Nitrat	273 \pm 35	535 \pm 99

Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit 10 mM Nitrat war die *alsS-lacZ* Expression in der *rex*-Mutante verglichen mit der im WT etwa zweifach dereprimiert. Unter diesen Bedingungen ist das NAD^+ -Level in der Zelle hoch und Rex somit aktiv. So reprimiert Rex wahrscheinlich durch Bindung an die potentielle Rex-Bindestelle im *alsSD* Promotor die Expression des Operons. In einer *rex*-Mutante kann diese Bindung nicht erfolgen, was in einer fehlenden aeroben Repression und Nitratrepression der *alsS-lacZ* Reporterfusion resultiert. Obwohl Rex *in vitro* an die potentielle Rex-Bindestelle im *alsSD* Promotor nur schlecht binden kann, ist Rex *in vivo* für die Repression der *alsSD* Operon Expression unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit Nitrat verantwortlich. Das Modell zu Regulation der Anaerobiose in *B. subtilis* kann um eine Rex-abhängige Nitratrepression des *alsSD* Operons erweitert werden (Abb. 40).

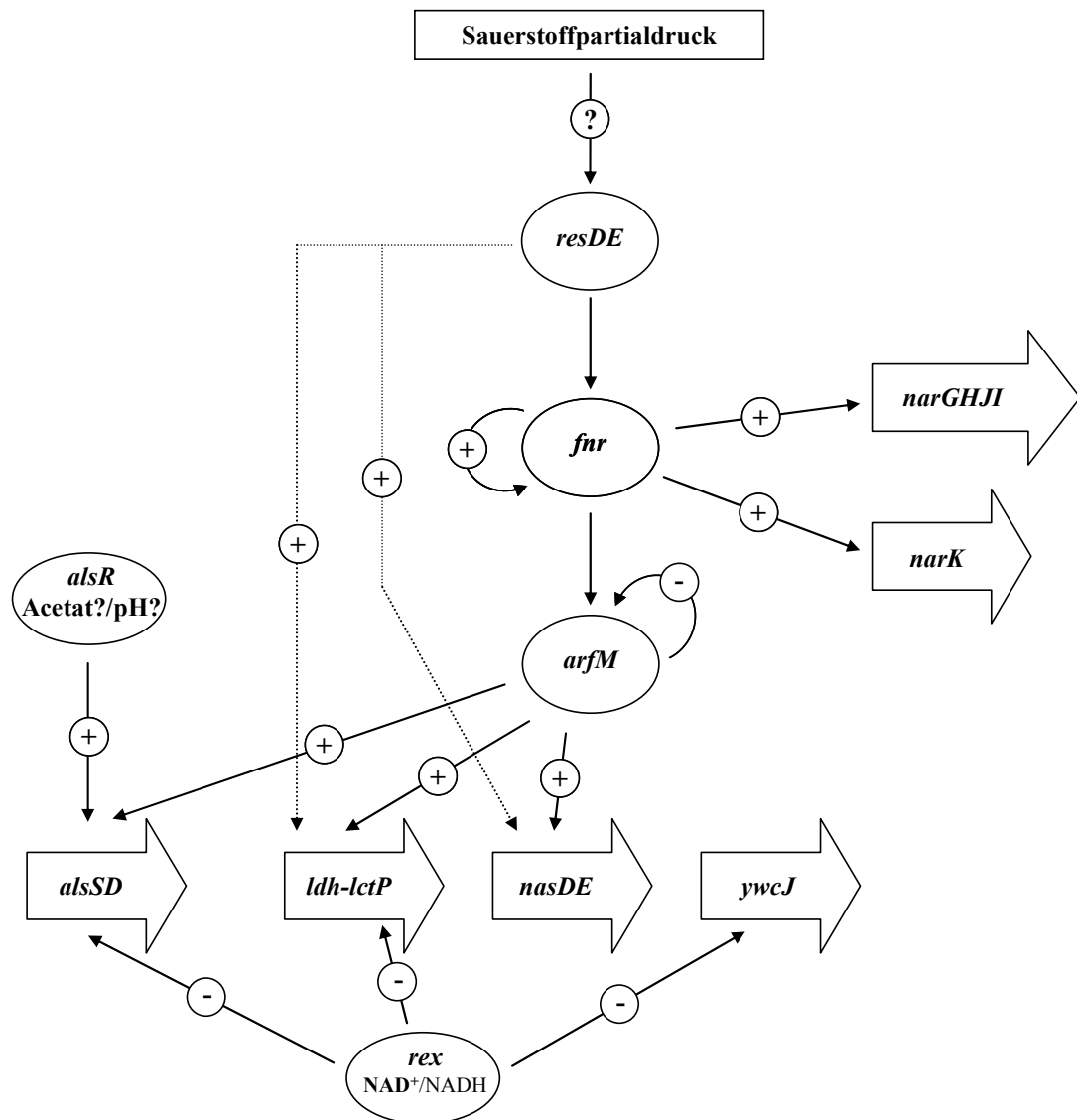


Abb. 40 Aktualisiertes Modell zur Regulation der Anaerobiose in *Bacillus subtilis*. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck phosphoryliert die Sensorkinase ResE den Response-Regulator ResD. Dieser induziert daraufhin die Expression des Gens *fnr*. Fnr zeigt eine positive Autoregulation und induziert die Transkription von *narGHJI*, *narK* und *arfM*. ArfM verstärkt die Expression der Operons *alsSD*, *ldh-lctP* und *nasDE* und zeigt eine negative Autoregulation. Rex inhibiert bei hohem NAD^+/NADH -Verhältnis die Expression des *ldh-lctP* und *alsSD* Operons und des Gens *ywcJ*. AlsR induziert die Transkription des *alsSD* Operons.

Zusätzlich erklärt die Bindung von Rex an den *alsSD* Promotor während der aeroben und anaeroben Atmung auch die fehlende Nitratrepression von *alsS-lacZ* in einer *fnr*-Mutante. In einer *fnr*-Mutante findet keine Nitratatmung statt, da die Expression der hierfür benötigten Gene (z.B. die des *narGHJI* Operons, das für die Nitratreduktase kodiert) nicht von Fnr aktiviert werden kann. Daher muss eine *fnr*-Mutante unter Sauerstoffausschluss auch in Anwesenheit von Nitrat Energie durch Fermentation gewinnen. Unter fermentativen Bedingungen herrscht in der Zelle ein hohes NADH-Level. In der Folge bindet Rex nicht an die Promotoren seiner Zielgene, so dass deren Transkription nicht reprimiert wird. Eine *fnr*-Mutante zeigt

daher keine Nitratrepression von *alsS-lacZ*, wobei dieser Effekt nicht direkt über Fnr sondern indirekt über Rex vermittelt wird.

4.5 Das AlsR-Regulon

Um zu untersuchen, ob AlsR neben der Regulation der *alsSD* Operon Expression die Expression weiterer Gene oder Operons reguliert, wurden DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. So sollte ein AlsR-Regulon definiert werden. Hierfür wurde das Transkriptom der *B. subtilis* Stämme JH642 (Wildtyp, Tab. 4) und AMBs2 ($\Delta alsR$, Tab. 4) unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit Zugabe von 40 mM Acetat sowie unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit einem von 7 auf 6 verringerten pH-Wert jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Diese Bedingungen wurden für die Transkriptom-Analysen ausgewählt, da die Expression des *alsSD* Operons unter diesen Bedingungen *alsR*-abhängig jeweils stark induziert ist. Dies bedeutet AlsR ist unter diesen Bedingungen aktiv und in der Lage, die Expression von Genen zu regulieren. Weiterhin kann durch diese Vorgehensweise untersucht werden, ob unter den zwei gewählten Wachstumsbedingungen ähnliche oder unterschiedliche *alsR*-abhängige Expressionsprofile zu verzeichnen sind.

Verwendet wurden DNA-Microarrays der Firma Agilent (Agilent, Santa Clara, USA), die nach Angaben der Arbeitsgruppe Mäder an der Universität Greifswald hergestellt wurden. Hierbei entsprechen drei bis fünf Oligonukleotide mit jeweils 60 nt Länge jeweils der kodierenden Sequenz eines Gens. Auf jedem Microarray-Slide befanden sich vier Microarrays, so dass für jede Wachstumsbedingung eine Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Die Qualität der für die Hybridisierungen der DNA-Microarrays verwendeten Gesamtzell-RNA wurde durch Verwendung eines Bioanalyzers in Kombination mit einem RNA Nano Chip kontrolliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und während dieses Prozesses mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 markiert. Die Einbaurate des Fluoreszenzfarbstoffs Cy3 in Nukleinsäuren ist stets höher als für Cy5. Um dies auszugleichen, wurde die RNA beider Stämme bei der cDNA-Synthese jeweils zweimal mit Cy3 und zweimal mit Cy5 fluoreszenzmarkiert. Zur Hybridisierung der DNA-Microarrays wurden pro Microarray gleiche Mengen der unterschiedlich markierten cDNA von den zu vergleichenden Stämmen einer Wachstumsbedingung eingesetzt.

Durch Vergleich der Transkriptome des Wildtyps und der *alsR* Mutante wurden die Gene bestimmt, die in Abhängigkeit von *alsR* reguliert wurden. Dabei wurden Gene als von AlsR reguliert betrachtet, wenn der natürliche Logarithmus (Ln) des „Fold Changes“ (FC) einen definierten Schwellenwert überschritt. Der FC gibt stets an, um welchen Faktor stärker oder geringer ein Gen im Wildtyp verglichen mit der *alsR* Mutante exprimiert wurde. Um sicherzustellen, dass nur in ihrer Expression signifikant veränderte Gene in die Auswertung einbezogen wurden, wurde als Schwellenwert für die veränderte Expression eines Gens oder einer intergenischen Region (IGR) ein Ln FC von $\pm 1,4$ definiert. Die Expression von Genen mit einem positiven Ln FC wurde *alsR*-abhängig induziert, die Expression von Genen mit einem negativen Ln FC *alsR*-abhängig reprimiert. Hierbei entsprach ein Ln FC von 1,4 einer im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante 2,6-fach höheren Expression. Ein Ln FC von -1,4 entsprach einer im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den Faktor 2,6 geringeren Expression.

Bei einigen im Folgenden aufgeführten Genen lag der Ln FC unter dem definierten Schwellenwert. Diese Gene wurden trotzdem in die Auswertung mit einbezogen, da sie im Zusammenhang einzelner Prozesse in der Zelle von Bedeutung sind. Ihr Ln FC unterschritt nie den Wert von 1,0, was immer noch einer zweifachen Änderung der Expression entsprach.

Im folgenden Text wird der Ln FC von Genen, die in einem Operon liegen, zur Vereinfachung als durchschnittlicher Ln FC des gesamten Operons angegeben. Die Einzelheiten der gesamten Daten der Microarray-Analysen sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen (Tab. A-1 für das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat und Tab. A-2 für das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit einem von 7 auf 6 verringerten externen pH-Wert). Die Auswertung der Microarray-Analysen, die in diesen Tabellen dargestellt sind, beinhaltet die Funktion des jeweiligen Genprodukts innerhalb der Zelle (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Funktion in der Zelle“), eine postulierte Operonstruktur des *alsR*-abhängig regulierten Gens (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Operonstruktur“), den Namen des *alsR*-abhängig regulierten Gens (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Gen“), die Beschreibung des Genprodukts (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Genprodukt/Beschreibung“), den Induktions-/Repressionsfaktor der Expression des jeweiligen Gens dargestellt als Ln FC (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Ln FC WT/ Δ *alsR*“), die Sequenz potentieller AlsR-Boxen im Promotor des *alsR*-abhängig

regulierten Gens (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Potentielle AlsR-Box“) und die Lokalisation der potentiellen AlsR-Boxen in Bezug auf den Translationsstartpunkt des *alsR*-abhängig regulierten Gens (Tab. A-1 und A-2, Spalte „Distanz zu ATG“). Die Beschreibungen der Gene und der Eigenschaften ihrer Genprodukte wurden den Datenbanken GenoList (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList>), UniProt (<http://uniprot.org>) und SubtiWiki (http://subtiwiki.uni-goettingen.de/wiki/index.php/Main_Page) entnommen (Consortium, 2010; Florez *et al.*, 2009; Lammers *et al.*, 2010; Lechat *et al.*, 2008). Vorhersagen für AlsR-Bindestellen in den Promotoren dieser Gene und Operons wurden mittels der Datenbank PRODORIC® (<http://prodoric.tu-bs.de>) erstellt (Münch *et al.*, 2003). Da nicht von jedem Gen bzw. Operon in *B. subtilis* der Transkriptionsstartpunkt bekannt ist, konnten Aussagen über die Lokalisation potentieller AlsR-Bindestellen in den entsprechenden Promotoren nur in Bezug auf den Translationsstartpunkt gemacht werden. Im *alsSD* Promotor, in dem die AlsR-Box definiert wurde, liegt diese an Position -126/-108 (zentrale Position -117) in Relation zum Translationsstartpunkt.

4.5.1 Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat

Unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat war die Expression von 80 Genen durch die Mutation des *alsR* Gens beeinflusst. Hierbei wurde die Expression von 59 Genen *alsR*-abhängig induziert und von 21 Genen *alsR*-abhängig reprimiert (Tab. A-1).

Der größte Unterschied in der Expression war beim *alsSD* Operon zu beobachten. Bei diesem war der ln FC von *alsS* 4,68, der von *alsD* 4,74 (Tab. A-1). Diese Werte entsprachen jeweils ungefähr einer um den Faktor 26 erhöhten Expression des *alsSD* Operons im WT verglichen mit der *alsR* Mutante. Durch diese Microarray-Analysen konnte die bereits bekannte *alsR*-abhängige Expression des *alsSD* Operons reproduziert werden.

Zusätzlich zur Expression des *alsSD* Operons war die Expression weiterer Gene beeinflusst. Beispielsweise betrug der ln FC des *ilvBHC-leuABCD* Operons durchschnittlich 1,26, was einer um den Faktor 2,4 erhöhten Expression dieses Operons im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante entsprach. Die Genprodukte dieses Operons kodieren für Enzyme der Isoleucin- und Valinbiosynthese. Hierbei kodieren die Gene *ilvB* und *ilvH* für die große (IlvB) und kleine Untereinheit (IlvH) einer

zusätzlich zu AlsS vorhandenen Acetolactatsynthase. Diese Acetolactatsynthase synthetisiert ein Molekül Acetolactat aus zwei Molekülen Pyruvat oder ein Molekül α -Acetohydroxybutyrat aus einem Molekül Pyruvat und einem Molekül α -Ketobutyrat. Diese Produkte dienen als Vorläufer für die Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAAs, „*branched chain amino acids*“) Valin und Isoleucin (Renna *et al.*, 1993). Obwohl die Acetolactatsynthasen AlsS und IlvB/H in unterschiedlichen Bereichen des Stoffwechsels benötigt werden, könnte die Expression ihrer Gene über den gemeinsamen Regulator AlsR reguliert werden.

Zusätzlich zu Genen zur Acetolactatsynthese wurde ein Gen in seiner Expression durch *alsR* beeinflusst gefunden, dessen Genprodukt an der Deazidifikation des Cytoplasmas beteiligt sein könnte. Das Gen *oxdC* bildet ein Operon mit dem Gen *yvrL*, dessen Expression allerdings nicht durch die *alsR*-Mutation beeinflusst wurde. *yvrL* kodiert für ein Protein unbekannter Funktion, *oxdC* für eine Oxalatdecarboxylase, die Oxalat und H^+ -Ionen zu Formiat und CO_2 umsetzt und so die Konzentration an H^+ -Ionen reduziert. Die Expression von *oxdC* war im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 3,02 erhöht, was einer etwa achtfach verstärkten Expression entsprach. Dass *oxdC* an der Deazidifikation des Cytoplasmas beteiligt sein könnte, stellt eine Parallele zum *alsSD* Operon dar. Für dessen Genprodukte wurde ebenfalls bereits postuliert, dass sie an der Konstanthaltung des internen pH-Werts verantwortlich sein könnten (Holtzclaw and Chapman, 1975). Da also die Funktionen der Genprodukte des *alsSD* Operons und des *oxdC* Gens einen gemeinsamen Schnittpunkt haben, könnte es möglich sein, dass beide von AlsR reguliert werden. Im Promotor des *oxdC* Gens befinden sich an verschiedenen Positionen potentielle AlsR-Bindestellen, die jeweils in zwei Basen von der Konsensussequenz TAAT-N₁₁-ATTA abweichen (Tab. A-1). Durch DNA-Bindungsstudien mit AlsR und einem *oxdC* Promotorfragment könnte untersucht werden, ob eine dieser potentiellen AlsR-Bindestellen funktionell ist.

In direkter Nachbarschaft von *oxdC* liegt auf dem Gegenstrang der DNA das Gen *yvrI*, das divergent zu *oxdC* transkribiert wird und den alternativen Sigmafaktor YvrI kodiert. Dieser induziert u.a. die Expression des *oxdC-yvrL* Operons. Die Expression von *yvrI* war im WT verglichen mit der *alsR* Mutante um den Faktor 1,4 erhöht. Im Promotor des *yvrI* Gens befindet sich an Position -184 in Bezug auf den Translationsstartpunkt des Gens eine potentielle AlsR-Bindestelle, die in zwei Basen von der Konsensussequenz der AlsR-Bindestelle abweicht. Falls diese Bindestelle

trotz der zwei Basenaustausche funktionell ist, wäre es möglich, dass AlsR die Expression des *oxdC* Gens indirekt über eine verstärkte Transkription des Sigmafaktors YvrI bewirkt.

Ein Großteil der weiteren Gene, die bei den Microarray-Analysen unter fermentativen Bedingungen mit Acetat als *alsR*-abhängig reguliert gefunden wurden, ist an Sporulationsprozessen von *B. subtilis* beteiligt. Hier ist z.B. das *yqxM-sipW-tasA* Operon zu nennen, dessen Genprodukte an der Biofilmbildung und Sporulation beteiligt sind. Hierbei kodiert *yqxM* für ein unbekanntes Protein, das essentiell für die korrekte Lokalisation der antimikrobiellen Sporenkomponente TasA in die Matrix ist. *sipW* kodiert die Signalpeptidase SipW, welche das Signalpeptid von TasA abspaltet. Die Expression dieses Operons war im WT im Vergleich zur *alsR*-Mutante durchschnittlich um den ln FC 3,28 erhöht. Im Promotor des Operons befinden sich sechs potentielle AlsR-Bindestellen. Eine dieser potentiellen Bindestellen weicht in nur einer Base von der AlsR-Konsensussequenz ab. Sie befindet sich an Position -130 in Bezug auf den Translationsstartpunkt des Operons und damit in einer ähnlichen Entfernung wie die AlsR-Box im *alsSD* Promotor in Bezug zu dessen Translationsstartpunkt. Dies sind Hinweise darauf, dass die Regulation des *yqxM-sipW-tasA* Operons direkt durch AlsR erfolgen könnte und nicht durch einen sekundären Effekt verursacht wird.

Weiterhin war z.B. die Expression der Gene *spoIIAA*, *spoIIAB* und *sigF* durchschnittlich um den ln FC 1,87 sowie die der Gene *spoIIGA* und *sigE* durchschnittlich um den ln FC 1,08 jeweils im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante erhöht (Tab. A-1). Die Gene *spoIIAA* und *spoIIAB* kodieren für einen Anti-Sigmafaktor F (*spoIIAB*) und Anti-anti-Sigmafaktor F (*spoIIAA*), das Gen *sigF* für den Sigmafaktor F (σ^F). Potentielle AlsR-Bindestellen mit jeweils zwei Basenaustauschen sind in den Promotoren dieser Gene bzw. Operons vorhanden (Tab. A-1). Über σ^F wird über eine Regulationskaskade in der Vospore die Expression weiterer Gene induziert (Abb. 41). Von diesen wurde das vosporenspezifische Gen *sspB* in seiner Expression als *alsR*-abhängig gefunden, seine Expression war im WT im Vergleich zur *alsR*-Mutante um den ln FC -1,87 verringert (Tab. A-1). An Position -4 in Bezug auf den Translationsstartpunkt von *sspB* befindet sich eine potentielle AlsR-Bindestelle. Die Lokalisation deutet auf eine repressorische Bindestelle hin, was damit übereinstimmt, dass das Gen *alsR*-abhängig im WT reprimiert wurde.

Zusätzlich wurde in der Mutterzelle die Expression des Gens *spoIIGA*, das für die Pro-Sigma E Protease SpoIIIGA kodiert, *alsR*-abhängig im WT um den ln FC 1,05 erhöht gefunden (Tab. A-1). Über SpoIIIGA erfolgt die Reifung des alternativen, mutterzellspezifischen Sigmafaktors Sigma E (σ^E) (Abb. 41). Das Gen *spoIIGA* wird zusammen mit den Genen *sigE* und *sigG*, die die alternativen Sigmafaktoren σ^E und σ^G kodieren, als ein Operon transkribiert. Die Expression von *sigE* war im WT *alsR*-abhängig um den ln FC 1,11 erhöht, die Expression von *sigG* war jedoch nicht reguliert. Da Werte unter einem ln FC von 1 nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden, könnte ein verändertes *sigG*-Expressionslevel daher im Hintergrundrauschen untergegangen sein. Ausgehend von σ^E wird über eine Regulationskaskade der alternative Sigmafaktor Sigma K (σ^K) gebildet (Abb. 41). Dieser induziert die Expression weiterer Gene, deren Produkte an z.B. der Zell-Lyse beteiligt sind. Die Expression einiger Gene, die an der Zell-Lyse beteiligt sein könnten, wie z.B. *yocH*, *cidA* und *ywbG* wurde im Microarray als *alsR*-abhängig reguliert gefunden (Tab. A-1). Hierbei war die Expression von *yocH* im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 2,27 erhöht (Tab. A-1). *yocH* kodiert für das Protein YocH, das wahrscheinlich als Murein-Hydrolase am Zellwandturnover beteiligt ist. Der Promotor des Gens weist mehrere potentielle AlsR-Bindestellen mit jeweils zwei Basenaustauschen auf (Tab. A-1). Die Gene *cidA* und *ywbG* liegen wahrscheinlich in einem Operon vor. Sie kodieren für das holinähnliche Protein CidA und die Peptidoglykan-Hydrolase YwbG und sind damit putative Autolysine. Die Expression des Operons war im Durchschnitt um den ln FC -2,2 im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante reduziert (Tab. A-1). Im Promotor des Operons befindet sich an Position -51 eine potentielle AlsR-Bindestelle, die zwei Basenaustausche enthält (Tab. A-1). Es ist nicht auf den ersten Blick schlüssig, warum AlsR die Expression des *cidA-ywbG* Operons reprimiert, während andere sporulationsspezifische Gene und Operons in ihrer Expression induziert werden. Es könnte sein, dass diese Repression nur bis zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, an dem dann die Mutterzelle lysiert wird. Es könnte sich auch um den indirekten Effekt eines unbekannten, weiteren Faktors handeln.

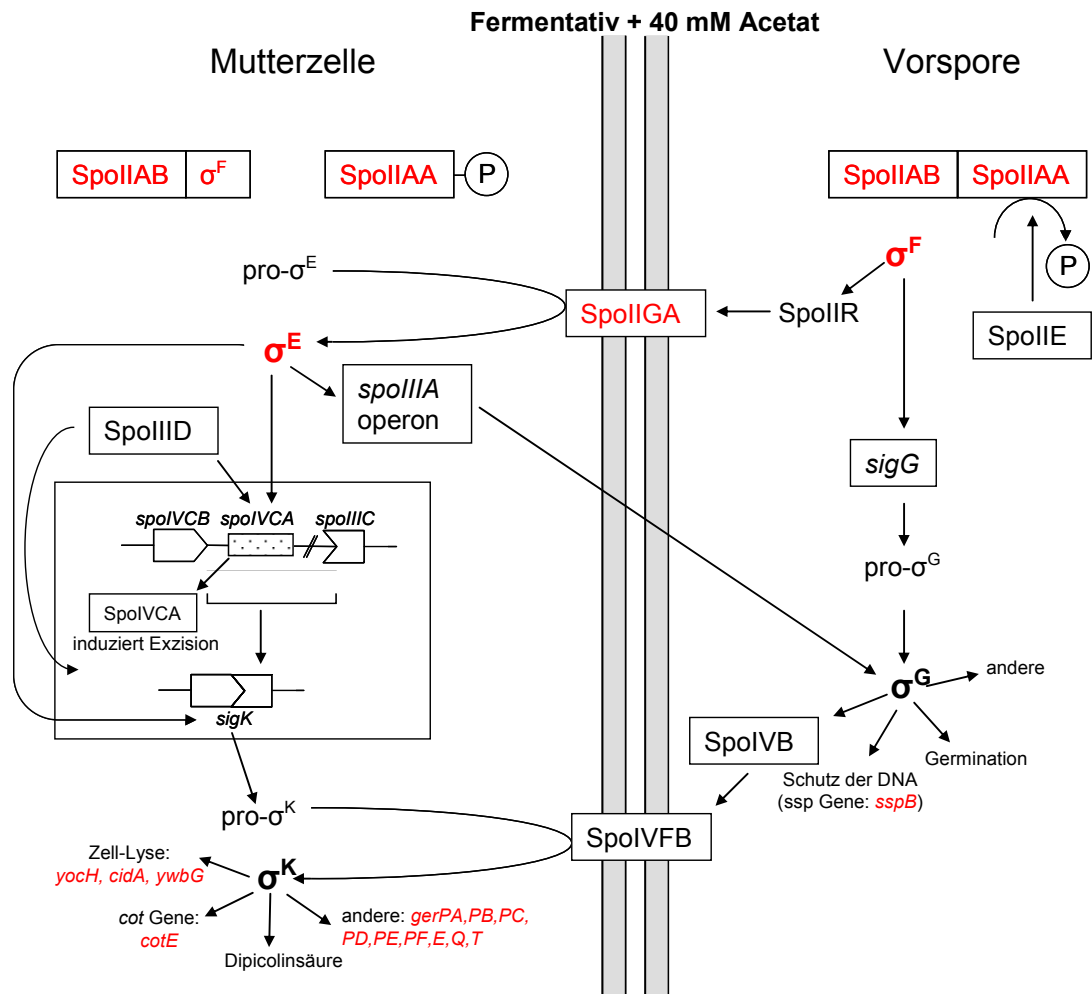


Abb. 41 Regulationsschema der Sporulation in *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von *alsR* unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat. Dargestellt ist die schematische Regulation der Sporulation in einer *B. subtilis* Zelle. Die Zelle ist in Mutterzelle und Vorspore unterteilt. Gene, deren Expression im WT im Vergleich zur *alsR*-Mutante verändert war, sind in roter Schrift dargestellt. Die Expression der Gene *cidA*, *ywbG* und *sspB* wird *alsR*-abhängig reprimiert, die der restlichen Gene induziert.

Diesen Ergebnissen zufolge wäre es möglich, dass AlsR unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat als transkriptioneller Regulator eine Rolle bei der Sporulation von *B. subtilis* spielt. Dabei scheint AlsR die Expression von Genen sowohl in der Mutterzelle als auch in der Vorspore zu induzieren, bzw. in wenigen Fällen zu reprimieren. Diese Ergebnisse müssten noch vertiefend untersucht werden. Beispielsweise könnte untersucht werden, ob eine *alsR*-Mutante noch in der Lage zur Sporulation ist. Dies müsste jedoch unter aeroben Bedingungen untersucht werden, da *B. subtilis* unter fermentativen Wachstumsbedingungen nicht sporulieren kann (Hoffmann *et al.*, 1995). Der Grund hierfür ist bislang nicht bekannt. Es könnte sein, dass der Sporulationsprozess von *B. subtilis* sauerstoffabhängig ist. Eine vergleichende Transkriptom-Analyse eines *B. subtilis* WT-Stamms und einer *alsR*-Mutante unter aeroben Bedingungen könnte hier weitere Aufschlüsse liefern.

Weiterhin könnten zur genaueren Untersuchung der Rolle von AlsR in der Sporulation Reporterfusionen sporulationsspezifischer Gene in einer *alsR*-Mutante unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Zusätzlich könnten zur Bestimmung von direkten oder indirekten AlsR-Effekten Gelretardationsanalysen oder *in vitro* Transkriptionsanalysen durchgeführt werden.

Zusätzlich zu den sporulationsspezifischen Genen wurden weitere Gene unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat *alsR*-abhängig reguliert. Beispielsweise wurde die Expression des *purEKBCSQLFMNHD* Operons (*pur* Operon), dessen Genprodukte für die Purinsynthese verantwortlich sind, im Durchschnitt um den ln FC -1,5 reprimiert (Tab. A-1). Weiterhin wurde die Expression des Gens *hag* und des *yvyC-fliDST* Operons, dessen Genprodukte flagellare Proteine sind, um den ln FC von durchschnittlich -1,65 reprimiert (Tab. A-1). Sowohl das *pur* Operon, das Gen *hag* als auch das *yvyC-fliDST* Operon besitzen jeweils mindestens eine potentielle AlsR-Bindestelle mit zwei Basenaustauschen in ihren Promotoren (Tab. A-1). Die Repression von Genen, deren Produkte der Purin- und damit der DNA-Synthese dienen oder für die Motilität benötigt werden, ist unter Bedingungen, bei denen die Sporulation einer Zelle eingeleitet ist, sinnvoll. Zusätzlich wurde die Expression des *xis-ydcOPQ-nickYdcST-yddABC* Operons im WT *alsR*-abhängig um einen durchschnittlichen ln FC von 1,2 induziert (Tab. A-1). Das gesamte Operon wird als integratives und konjugatives Element von *B. subtilis* („*integrative and conjugative element of B. subtilis*“, ICEBs1) bezeichnet und ist ein Transposon. Das Gen *xis* kodiert hierbei für die Exzisionase Xis, die das integrative Transposon ICEBs1 aus dem *trnS-leu2* Locus herausschneidet. Xis schneidet ICEBs1 u.a. dann aus dem Genom heraus, wenn DNA-Schäden detektiert werden. Eventuell könnte die eingeleitete Sporulation ebenfalls ein Signal zum Herausschneiden von ICEBs1 aus dem Chromosom sein.

Weitere Gene und Operons, deren Expression *alsR*-abhängig im WT positiv reguliert wurde, waren das *appDFABC* Operon, dessen Genprodukte am Transport von Oligopeptiden beteiligt sind, und das *yxbBA-yxnB-asnH-yxaM* Operon, dessen Genprodukte wahrscheinlich an der Synthese von Asparagin beteiligt sind (Tab. A-1). Die Expression der Gene *yvzB*, *pel* und *serS* war *alsR*-abhängig im WT reprimiert. Diese Gene kodieren für ein unbekanntes Protein, die Pectatlyase C, sowie eine Seryl-tRNA-Synthetase (Tab. A-1).

4.5.2 Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit einem von 7 auf 6 verringerten externen pH-Wert

Unter fermentativen Bedingungen mit einem externen pH-Wert von 6 (pH_{ex} 6) war die Expression von insgesamt 129 Genen *alsR*-abhängig beeinflusst. Hierbei war der größte Expressionsunterschied zwischen WT und *alsR*-Mutante beim *alsSD* Operon zu beobachten. Bei diesem war der ln FC von *alsS* 4,44, der von *alsD* 4,53 (Tab. A-1). Diese Werte entsprachen jeweils einer ungefähr um den Faktor 24 erhöhten Expression des *alsSD* Operons im WT verglichen mit der *alsR* Mutante.

Zusätzlich war z.B. die Expression des *acoABCL* Operons im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante im Durchschnitt um den ln FC 2,4 erhöht (Tab. A-2). Das Operon kodiert für die Acetoindehydrogenase, die für die Verwertung von Acetoin zuständig ist. Seine Expression wird positiv durch den Regulator AcoR reguliert. An Position -17 im Promotor des Operons befindet sich eine potentielle AlsR-Bindestelle, die, verglichen mit der Konsensussequenz der AlsR-Box, einen Basenaustausch enthält. Die Lokalisation der potentiellen AlsR-Bindestelle im Promotor des *acoABCL* Operons lässt auf eine repressorische Bindestelle schließen. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Operons induziert. Dies könnte eventuell auf einen bislang unbekannten sekundären Effekt zurückzuführen sein.

Weiterhin war die Expression des Gens *kata*, das für die vegetative Katalase I kodiert, im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 2,18 induziert (Tab. A-2). Die Expression von *kata* wurde bereits als säureinduziert beschrieben (Wilks *et al.*, 2009). Es wäre möglich, dass diese säureabhängige Induktion von *kata* über AlsR erfolgt.

Zusätzlich war die Expression *yqxM-sipW-tasA* Operons im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante im Durchschnitt um den ln FC 1,1 induziert. Eine Beschreibung des Operons und seiner Genprodukte ist in Kap. 4.5.1 zu finden. Unter fermentativen Bedingungen mit Acetat war die Expression dieses Operons im WT etwa dreimal stärker induziert.

Der Großteil der weiteren *alsR*-abhängig regulierten Gene ist an Sporulationsprozessen von *B. subtilis* beteiligt. Beispielsweise war die Expression der Gene *spoIIAA*, *spoIIAB* und *sigF* durchschnittlich um den ln FC 1,51 erhöht (Tab. A-2). Diese Expressionsrate ist vergleichbar mit der unter fermentativen Bedingungen mit 40 mM Acetat (Kap. 4.5.1). Potentielle AlsR-Bindestellen im Promotor des Operons wurden in Kap. 4.5.1 beschrieben. Durch Bindung des Anti- σ^F , kodiert vom Gen

spoIIAB, durch den Anti-anti- σ^F , kodiert vom Gen *spoIIAA*, wird σ^F in der Vorspore prozessiert und somit aktiv (Abb. 42). Durch den vorsporenspezifischen σ^F erfolgt die Aktivierung des ebenfalls vorsporenspezifischen Sigmafaktors G (σ^G). Die Transkription des Gens *sigG*, das für σ^G kodiert, war im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 2,09 induziert. Das Gen *sigG* liegt in einem Operon mit den Genen *spoIIIGA* und *sigE*, deren Expression jedoch nicht *alsR*-abhängig beeinflusst war. Dies spricht dafür, dass die Expression von *sigG* nicht direkt *alsR*-abhängig reguliert wird, sondern indirekt über σ^F . σ^G -abhängig wird in der Vorspore die Expression einer Reihe von Genen induziert, deren Genprodukte z.B. dem Schutz der DNA dienen (Abb. 42). σ^G -regulierte Gene wurden in ihrer Expression nicht zusätzlich *alsR*-abhängig reguliert (Abb. 42).

In der Mutterzelle wurde die Expression der Gene *spoIVCB* bzw. *spoIIIC* im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 2,94 bzw. 2,88 induziert (Tab. A-2). Diese Gene kodieren für die N- und C-terminale Hälfte des sporulationsspezifischen Sigmafaktors Sigma K (σ^K). Da weder im Promotor von *spoIVCB* noch im Promotor von *spoIIIC* eine potentielle AlsR-Bindestelle vorhanden ist, ist die Expression dieser Gene wahrscheinlich nicht direkt *alsR*-abhängig, sondern könnte über einen weiteren, bislang unbekannten Faktor vermittelt werden. Die Reifung von σ^K erfolgt über mehrere Schritte, auf die hier nicht näher eingegangen wird (Abb. 42). σ^K -abhängig erfolgt in der Mutterzelle die Aktivierung der Expression weiterer Gene, von denen einige zusätzlich *alsR*-abhängig reguliert sind (Abb. 42). Von den zusätzlich *alsR*-abhängigen Genen betrug z.B. der ln FC des Gens *yocH* 1,44 und der des *cidA-ywbG* Operons -1,56. Eine Beschreibung dieser Gene und ihrer Genprodukte befindet sich in Kap. 4.5.1. Zusätzlich war die Expression diverser *cot* Gene *alsR*-abhängig im WT induziert (Tab. A-2 und Abb. 42). *cot* Gene kodieren für Sporenmantel-Proteine, die oft auch zur Sporenresistenz beitragen (Tab. A-2). Hier ist z.B. das *cotVWXYZ* Operon zu nennen, dessen Expression im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante durchschnittlich um den ln FC 4,56 induziert war (Tab. A-2). Im Promotor des Operons befinden sich mehrere potentielle AlsR-Bindestellen, die jeweils in zwei Basen von der AlsR-Konsensussequenz abweichen (Tab. A-2). Abgesehen von dem Gen *cotA* besitzen die weiteren *cot* Gene und *cot* Operons mindestens eine potentielle AlsR-Bindestelle in ihren jeweiligen Promotoren. Diese weichen stets in zwei Basen von der AlsR-Konsensussequenz ab (Tab.

A-2). Ob direkte oder indirekte Effekte für die *alsR*-abhängige Induktion dieser Gene und Operons verantwortlich sind, bleibt zu untersuchen.

Weiterhin war die Expression von Genen, deren Genprodukte an der Dipicolinsäure-Synthese beteiligt sind, im WT *alsR*-abhängig induziert (Tab. A-2 und Abb. 42). Auch die Expression von Genen, die an der Germination beteiligt sind, waren in Abhängigkeit von *alsR* im WT induziert (Tab. A-2 und Abb. 42).

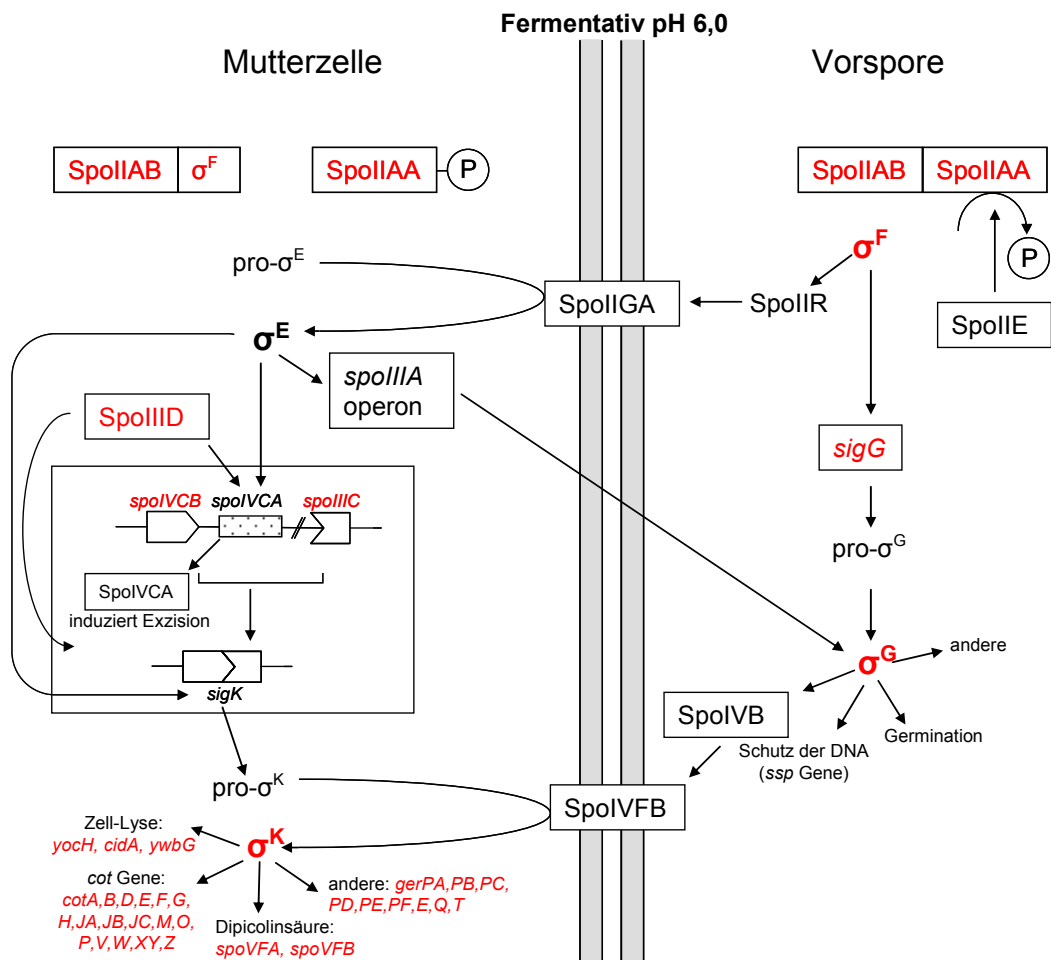


Abb. 42 Regulationsschema der Sporulation in *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von *alsR* unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit verringertem externen pH-Wert (pH 6). Dargestellt ist die schematische Regulation der Sporulation in einer *B. subtilis* Zelle. Die Zelle ist in Mutterzelle und Vorspore unterteilt. Gene, deren Expression im WT im Vergleich zur *alsR*-Mutante verändert war, sind in roter Schrift dargestellt. Die Expression des *cidA-ywbG* Operons ist *alsR*-abhängig reprimiert, die Expression der restlichen *alsR*-abhängigen Gene ist jeweils in Abhängigkeit von *alsR* induziert.

Zusätzlich zu Genen, die an der Sporulation beteiligt sind, war das *pyrRPBC-AA-AB-KDFE* Operon im WT verglichen mit der *alsR*-Mutante um den ln FC 1,49 induziert (Tab. A-2). Im Promotor dieses Operons befindet sich eine potentielle AlsR-Bindestelle, die in einer Base von der AlsR-Konsensussequenz abweicht, an Position -143 in Bezug auf den Translationsstartpunkt des Operons. Es ist nicht

ersichtlich, zu welchem Zweck die Induktion dieses Operons unter den gewählten Bedingungen erfolgt. Dies könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Weiterhin war die Expression des *lrgAB* Operons, das für die antiholinähnlichen Proteine LrgA und LrgB kodiert, im WT im Vergleich zur *alsR*-Mutante um den Ln FC 2,2 induziert (Tab. A-2). Dies ist besonders von Interesse, da die Expression dieses Operons bereits bei Transkriptom-Analysen unter Bedingungen mit einem verringerten externen pH-Wert (pH 6) induziert gefunden wurde. Diese Induktion könnte also *alsR*-abhängig sein.

Zusätzlich wurde die Expression weiterer Gene *alsR*-abhängig reguliert, wie beispielsweise das Gen *pel*, das für die Pectat-Lyase C kodiert oder das Gen *carB*, das für die B-Untereinheit der Carbamoylphosphat-Transferase kodiert (Tab. A-2).

Das AlsR-Regulon unter fermentativen Bedingungen mit Acetat war nicht identisch mit dem AlsR-Regulon unter fermentativen Bedingungen mit einem verringerten externen pH-Wert (pH 6). Die beiden Regulons haben jedoch Schnittpunkte. In beiden war die Expression des *alsSD* Operons deutlich *alsR*-abhängig induziert. Zusätzlich war unter beiden Bedingungen die Expression des *yqxM-sipW-tasA* und *cidA-ywbG* Operons induziert. Zusätzlich war bei beiden Regulons der Großteil der *alsR*-abhängig regulierten Gene an Sporulationsprozessen beteiligt. Einige dieser sporulationsspezifischen Gene, wie z.B. *spoIIAA*, *spoIIAB* und *sigF* wurden unter beiden Bedingungen *alsR*-abhängig reguliert. Auffällig ist die fehlende *alsR*-abhängige Regulation des *ldh-lctP* Operons unter beiden Bedingungen. Die Expression des *ldh-lctP* Operons wurde als *alsR*-abhängig beschrieben (Cruz Ramos *et al.*, 2000). Im Promotor des *ldh-lctP* Operons befindet sich keine potentielle AlsR-Bindestelle, was zusätzlich zu der fehlenden *alsR*-abhängigen Regulation in den Microarray-Analysen gegen eine direkte Regulation durch AlsR spricht. Daher könnte die Expression dieses Operons von einem weiteren, bislang unbekannten Faktor reguliert werden.

Die durchgeführten Microarray-Analysen deuten an, dass AlsR nicht nur der Regulator des *alsSD* Operons sondern ein globaler Regulator in *B. subtilis* sein könnte. AlsR induziert die Expression des *alsSD* Operons z.B. unter fermentativen Bedingungen oder Bedingungen mit einem niedrigen externen pH-Wert und ist daher unter verschiedenen Bedingungen aktiv. Zusätzlich konnte durch die hier durchgeführten Microarray-Analysen gezeigt werden, dass AlsR scheinbar an der

Regulation diverser zellulärer Prozesse beteiligt ist. Daher ist AlsR nicht als klassischer an der Anaerobiose von *B. subtilis* beteiligter Regulator zu betrachten, sondern vielmehr als globaler Regulator, der abhängig von einem bislang unbekannten Effektor in der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse eine Rolle spielt.

Microarray-Analysen sind stets der Ausgangspunkt für weitere Fragestellungen. Hier könnte z.B. weiter untersucht werden, welche Rolle AlsR bei der Regulation einzelner Gene spielt. Dies könnte z.B. durch DNA-Bindungsstudien geschehen, mit denen eine direkte Interaktion von AlsR mit den Promotoren ausgewählter Gene nachgewiesen werden könnte. Zusätzlich könnten die Ergebnisse durch reverse „*Real-Time*“-PCR bestätigt und erweitert werden. Weitere Microarray-Analysen, z.B. der Transkriptom-Vergleich von eines *B. subtilis* WT-Stamms und einer *alsR*-Mutante unter aeroben Bedingungen könnten weitere Aufschlüsse über die Rolle von AlsR in verschiedenen zellulären Prozessen, z.B. der Sporulation, liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das *alsSD* Operon, dessen Produkte für die Enzyme der Acetoinbiosynthese kodieren, wird in *B. subtilis* vom transkriptionellen Regulator AlsR reguliert. In dieser Arbeit konnte AlsR aus *B. subtilis* erstmals heterolog in löslicher Form in *E. coli* produziert und anschließend durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt werden. Nach Reinigung und Abspaltung des Affinitäts- und Löslichkeits-Tags konnte eine spezifische Bindung von AlsR an ein *alsSD* Promotorfragment durch Gelretardationsanalysen gezeigt werden. Mittels DNaseI-Protektionsanalysen konnte die Binderegion bestimmt werden, an die AlsR innerhalb des *alsSD* Promotors bindet. Nach ortsgerichteter Mutagenese und anschließender *alsS-lacZ* Expressionsanalyse der mutierten *alsS-lacZ* Promotorfragmente konnte die AlsR-Box mit der Sequenz TAAT-N₁₁-ATTA definiert werden. Die AlsR-Box befindet sich in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt des Operons an Position -67 im *alsSD* Promotor. Basenabfolge und Lokalisation der AlsR-Box stimmen gut mit der generell an Position -65 lokalisierten T-N₁₁-A Konsensussequenz der LTTR-Familie überein.

Für AlsR wurde Acetat als Effektor postuliert, da die Expression von *alsS-lacZ* durch Zugabe von Acetat zum Wachstumsmedium induziert wird (Renna *et al.*, 1993). Der interne pH-Wert, Acetat und Lactat wurden u.a. als potentielle Effektoren von AlsR untersucht. Die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts (pH_i) von *B. subtilis* Zellen ergab unter fermentativen Wachstumsbedingungen einen pH_i von 7,5 und unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Nitrat einen pH_i von 7,4. Daher konnte der pH_i als Effektor von AlsR ausgeschlossen werden. Gelretardationsanalysen in Anwesenheit potentieller Effektoren führten zu keiner veränderten DNA-Bindungsfähigkeit von AlsR an den *alsSD* Promotor. Auch *in vitro* Transkriptionsanalysen in Anwesenheit potentieller Effektoren resultierten in keiner Änderung der *alsS* Transkriptmenge. Neben dem postulierten Effektor Acetat kommt auch Lactat als Effektor von AlsR in Frage.

Der Transkriptionsstartpunkt von *alsR* konnte durch „Primer Extension“-Analysen bestimmt werden. Zusätzlich wurde die *rex*-abhängige aerobe Repression und Nitratrepression von *alsS-lacZ* gezeigt.

Durch Microarray-Analysen wurde das AlsR-Regulon bestimmt. Neben der Regulation des *alsSD* Operons wurden vornehmlich Gene von AlsR reguliert gefunden, die an der Sporulation von *B. subtilis* beteiligt sind.

6 SUMMARY

The *B. subtilis alsSD* operon encodes enzymes for the acetoin biosynthesis and is regulated by the transcriptional regulator AlsR belonging to the LTTR family of transcriptional regulators. In this thesis AlsR was heterologously produced in a soluble form in *E. coli* for the first time. After purification and cleavage of the affinity- and solubility-tag a specific binding of AlsR to an *alsSD* promoter fragment was shown via gelretardation assays. Furthermore, DNaseI-protection analyses revealed the AlsR binding region in the promoter of the *alsSD* operon. Within this region, the sequence TAAT-N₁₁-ATTA was identified as AlsR-box by using site directed mutagenesis followed by *alsS-lacZ* expression analysis. The AlsR-box is located at position -67 with respect to the transcriptional start site of the *alsSD* operon. Sequence and localization of the AlsR-box are in agreement with the general LTTR consensus sequence T-N₁₁-A located at position -65 with respect to the transcriptional start site of the respective target gene.

Acetate was postulated as an effector of AlsR due to an acetate-dependent induction of *alsS-lacZ* expression (Renna *et al.*, 1993). Amongst others, the cytoplasmic pH, acetate and lactate were analyzed as potential effectors of AlsR. Determination of the intracellular pH (pH_i) under fermentative growth conditions resulted in a pH_i of 7.5 and under anaerobic growth conditions with 10 mM nitrate in a pH_i of 7.4. Therefore the pH_i was disproved as an effector for AlsR. Gelretardation assays in presence or absence of potential effectors did not lead to an altered binding affinity of AlsR to an *alsSD* promoter fragment. Additionally, *in vitro* transcription analyses in presence or absence of potential effectors did not lead to a change in *alsS* transcript amounts. Besides the postulated effector acetate lactate might be an effector of AlsR.

The transcriptional start site of *alsR* was determined via primer extension analysis. Additionally a *rex*-mediated aerobic and nitrate repression for *alsS-lacZ* was shown. The AlsR regulon was determined via microarray analyses. Besides the *alsSD* operon the main part of the AlsR-regulated genes were involved in sporulation.

7 AUSBLICK

Eine Möglichkeit, den Effektor von AlsR zu bestimmen, sind Kristallisationsanalysen. Durch Kristallstrukturen kann zum einen die genaue Struktur von AlsR aufklären. Zum anderen könnte durch Zugabe potentieller Effektoren zum Kristallisationsansatz nicht nur der Effektor an sich, sondern auch seine Lokalisation im Protein bestimmt werden. Für Kristallisationsanalysen muss AlsR in höheren Konzentrationen vorliegen. Versuche, die Proteinlösung zu konzentrieren, schlugen bislang fehl. Ab einer Konzentration von 0,8 mg/ml aggregierte AlsR und fällt sichtbar aus. Eine mögliche Lösung für dieses Problem könnte die Zugabe nicht-detergierender Substanzen sein, wie nicht-detergierende Sulfobetaine (z.B. NDSB-195). Die Zugabe von NDSB-195 führte bei CysB aus *K. aerogenes* bei der Konzentrierung des Proteins zu einer vier- bis fünffach höheren Konzentrationen (Verschuere *et al.*, 2000). Erste Versuche, die Löslichkeit von AlsR in höheren Konzentrationen durch Zugabe von NDSB-195 zu erreichen, waren bislang nicht erfolgreich. Allerdings können hier noch verschiedene Konzentrationen von NDSB195 sowie weitere NDSBs hinsichtlich eines positiven Einflusses auf die Löslichkeit von AlsR getestet werden.

Wenn AlsR in kristallisationsgeeigneten Mengen vorliegt, wäre eine Co-Kristallisation mit DNA interessant. Gebunden an DNA läge AlsR in seiner funktionalen Form vor. Die Bindung an DNA könnte einen stabilisierenden Einfluss auf AlsR haben, da die wHTH DNA-Bindedomäne sowie die Linker-Helix des Proteins durch DNA-Bindung eventuell weniger flexibel sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Löslichkeit von AlsR könnte dessen Produktion in einer N-terminal verkürzten Form sein. Bislang konnte mit CbnR aus *R. eutropha* lediglich die Kristallstruktur eines einzigen LTTRs in seiner vollen Länge aufgeklärt werden (Muraoka *et al.*, 2003a). Alle weiteren Kristallstrukturen wurden mit LTTRs erreicht, deren N-terminale DNA-Bindedomäne deletiert war. Dies war z.B. der Fall für OxyR aus *E. coli*, dessen Kristallstruktur mit einer N-terminal um 79 Aminosäurereste verkürzten Proteinvariante gelöst werden konnte (Choi *et al.*, 2001). N-terminal verkürzte AlsR-Varianten könnten also dazu führen, dass das Protein in kristallisationsgeeigneten Konzentration vorliegt. Damit könnten Kristallisationsansätze mit und ohne potentielle Effektoren durchgeführt werden, um sowohl die Struktur von AlsR aufzuklären als auch seinen Effektor zu bestimmen.

Die zufällige Mutagenese des *alsR* Gens könnte zu AlsR-Varinaten führen, die z.B. effektorunabhängig die Expression des *alsSD* Operons aktivieren oder aber im Gegenteil die *alsSD* Operon Expression nicht vermitteln können. Die Positionen der zugehörigen Aminosäure-Austausche könnte dann Aufschluss über strukturell oder funktionell wichtige Domänen innerhalb des Proteins liefern.

Die durchgeführten Microarray-Analysen haben eine Vielzahl von Genen als AlsR-reguliert ergeben, die an der Sporulation von *B. subtilis* beteiligt sind. Auch viele Gene, die für bislang unbekannte Proteine kodieren, wurden von AlsR beeinflusst gefunden. Diese Ergebnisse könnten durch reverse „*Real Time*“-PCR genauer untersucht werden. DNA-Bindungstudien mit den Promotoren dieser Gene würden des Weiteren Aufschluss darüber geben, ob die beobachteten Effekte in der Expression dieser Gene durch direkte Bindung von AlsR an deren Promotor erfolgt oder indirekter Natur ist.

8 REFERENZEN

- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 231-262.
- Barbe, V., Cruveiller, S., Kunst, F., Lenoble, P., Meurice, G., Sekowska, A., Vallenet, D., Wang, T., Moszer, I., Medigue, C., and Danchin, A. (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758-1775.
- Baruah, A., Lindsey, B., Zhu, Y., and Nakano, M.M. (2004) Mutational analysis of the signal-sensing domain of ResE histidine kinase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 1694-1704.
- Bundy, B.M., Collier, L.S., Hoover, T.R., and Neidle, E.L. (2002) Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7693-7698.
- Büttner, A. (2007) Der pH-abhängige Regulator AlsR aus *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S.E. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.
- Clark, T., Haddad, S., Neidle, E., and Momany, C. (2004) Crystallization of the effector-binding domains of BenM and CatM, LysR-type transcriptional regulators from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 105-108.
- Collier, L.S., Gaines, G.L., 3rd, and Neidle, E.L. (1998) Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* **180**: 2493-2501.
- Consortium, T.U. (2010) The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res* **38**: D142-148.
- Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., and Glaser, P. (1995) Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *Embo J* **14**: 5984-5994.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* **182**: 3072-3080.
- Debabov, V.G. (1982) *The molecular biology of the Bacilli*. New York: Academic Press New York.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J.K., Wendorff, M., Losi, A., Gartner, W., and Jaeger, K.E. (2007) Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**: 443-445.
- Ezezik, O.C., Haddad, S., Clark, T.J., Neidle, E.L., and Momany, C. (2007) Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J Mol Biol* **367**: 616-629.
- Farr, S.B., and Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**: 561-585.

- Florez, L.A., Roppel, S.F., Schmeisky, A.G., Lammers, C.R., and Stulke, J. (2009) A community-curated consensual annotation that is continuously updated: the *Bacillus subtilis* centred wiki SubtiWiki. *Database (Oxford)* **2009**: bap012.
- Fuhrer, T., Fischer, E., and Sauer, U. (2005) Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol* **187**: 1581-1590.
- Geng, H., Nakano, S., and Nakano, M.M. (2004) Transcriptional activation by *Bacillus subtilis* ResD: tandem binding to target elements and phosphorylation-dependent and -independent transcriptional activation. *J Bacteriol* **186**: 2028-2037.
- Geng, H., Zuber, P., and Nakano, M.M. (2007) Regulation of respiratory genes by ResD-ResE signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **422**: 448-464.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y., and Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P., and Nakano, M.M. (1995) Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 1112-1115.
- Hansen, H.G., and Henning, U. (1966) Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* **122**: 355-358.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., and Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6602-6606.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., and Jahn, D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett* **131**: 219-225.
- Holtzclaw, W.D., and Chapman, L.F. (1975) Degradative acetolactate synthase of *Bacillus subtilis*: purification and properties. *J Bacteriol* **121**: 917-922.
- Jovanovic, M., Lilic, M., Savic, D.J., and Jovanovic, G. (2003) The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of *hslJ* transcription in *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 3449-3459.
- Kashket, E.R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev* **46**: 233-244.
- Katz, E., and Demain, A.L. (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* **41**: 449-474.
- Kredich, N.M. (1992) The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 2747-2753.
- Kullik, I., Stevens, J., Toledano, M.B., and Storz, G. (1995) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol* **177**: 1285-1291.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., and *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lammers, C.R., Florez, L.A., Schmeisky, A.G., Roppel, S.F., Mader, U., Hamoen, L., and Stulke, J. (2010) Connecting parts with processes: SubtiWiki and SubtiPathways integrate gene and pathway annotation for *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **156**: 849-859.
- Larsson, J.T., Rogstam, A., and von Wachenfeldt, C. (2005) Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 3323-3335.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., and McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* **11**: 187-193.
- Lechat, P., Hummel, L., Rousseau, S., and Moszer, I. (2008) GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **36**: D469-474.
- Lindquist, S., Lindberg, F., and Normark, S. (1989) Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* beta-lactamase gene. *J Bacteriol* **171**: 3746-3753.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., and J, D. (1992) *Molekulare Zellbiologie*. Berlin/New York: De Gruyter
- Lopez, J.M., Thoms, B., and Rehbein, H. (1975) Acetoin degradation in *Bacillus subtilis* by direct oxidative cleavage. *Eur J Biochem* **57**: 425-430.
- Lu, Z., Takeuchi, M., and Sato, T. (2007) The LysR-type transcriptional regulator YofA controls cell division through the regulation of expression of *ftsW* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 5642-5651.
- Lynch, A.S., Tyrrell, R., Smerdon, S.J., Briggs, G.S., and Wilkinson, A.J. (1994) Characterization of the CysB protein of *Klebsiella aerogenes*: direct evidence that N-acetylserine rather than O-acetylserine serves as the inducer of the cysteine regulon. *Biochem J* **299 (Pt 1)**: 129-136.
- Maddocks, S.E., and Oyston, P.C. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**: 3609-3623.
- March, A. (2005) Die Rolle des Regulators AlsR im Acetoinstoffwechsel von *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Marino, M., Hoffmann, T., Schmid, R., Mobitz, H., and Jahn, D. (2000) Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology* **146 (Pt 1)**: 97-105.
- Marino, M., Ramos, H.C., Hoffmann, T., Glaser, P., and Jahn, D. (2001) Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*). *J Bacteriol* **183**: 6815-6821.
- McFall, S.M., Chugani, S.A., and Chakrabarty, A.M. (1998) Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* **223**: 257-267.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mukherjee, D., Saha, R.P., and Chakrabarti, P. (2009) Structural and unfolding features of HlyT, a tetrameric LysR type transcription regulator of *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 1134-1141.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E., and Jahn, D. (2003) PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* **31**: 266-269.

- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., and Senda, T. (2003a) Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* **328**: 555-566.
- Muraoka, S., Okumura, R., Uragami, Y., Nonaka, T., Ogawa, N., Miyashita, K., and Senda, T. (2003b) Purification and crystallization of a LysR-type transcriptional regulator CBNR from *Ralstonia eutropha* NH9. *Protein Pept Lett* **10**: 325-329.
- Myers, V.B., and Haydon, D.A. (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. *Biochim Biophys Acta* **274**: 313-322.
- Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., and Clark, D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* **179**: 6749-6755.
- Nakano, M.M., and Zuber, P. (1998) Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* **52**: 165-190.
- Nakano, M.M., Zhu, Y., Lacelle, M., Zhang, X., and Hulett, F.M. (2000) Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **37**: 1198-1207.
- Nicholson, W.L. (2008) The *Bacillus subtilis* *ydjL* (*bdhA*) gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6832-6838.
- Ogawa, N., McFall, S.M., Klem, T.J., Miyashita, K., and Chakrabarty, A.M. (1999) Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *J Bacteriol* **181**: 6697-6705.
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P., and Martin-Verstraete, I. (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 6889-6897.
- Priest, F.G. (1993) *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetic*. Washington DC: Am. Soc. Microbiol.
- Qi, Y., and Hulett, F.M. (1998) PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *Mol Microbiol* **28**: 1187-1197.
- Raskin, C., Gerard, C., Donfut, S., Giannotta, E., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., and Dusart, J. (2003) BlaB, a protein involved in the regulation of *Streptomyces cacaoi* beta-lactamases, is a penicillin-binding protein. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1460-1469.
- Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Bottger, L.H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A.X., Jahn, D., and Hartig, E. (2006a) *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol* **60**: 1432-1445.
- Reents, H., Munch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Hartig, E. (2006b) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 1103-1112.
- Renna, M.C., Najimudin, N., Winik, L.R., and Zahler, S.A. (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* **175**: 3863-3875.
- Schau, M., Chen, Y., and Hulett, F.M. (2004) *Bacillus subtilis* YdiH is a direct negative regulator of the *cydABCD* operon. *J Bacteriol* **186**: 4585-4595.

- Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626.
- Slepecky, R.A., and Hemphill, H.E. (1992) *The Prokaryotes*. New York: Springer Verlag New York.
- Smirnova, I.A., Dian, C., Leonard, G.A., McSweeney, S., Birse, D., and Brzezinski, P. (2004) Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J Mol Biol* **340**: 405-418.
- Speck, E.L., and Freese, E. (1973) Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **78**: 261-275.
- Spizizen, J. (1958) Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 1072-1078.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**: 845-857.
- Stragier, P., and Patte, J.C. (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. III. Nucleotide sequence and regulation of the lysR gene. *J Mol Biol* **168**: 333-350.
- Stragier, P., Richaud, F., Borne, F., and Patte, J.C. (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a lysR gene encoding an activator of the lysA gene. *J Mol Biol* **168**: 307-320.
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D., and Hulett, F.M. (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 1374-1385.
- Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stulke, J., and Hecker, M. (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 6996-7004.
- Tropel, D., and van der Meer, J.R. (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 474-500.
- Turinsky, A.J., Moir-Blais, T.R., Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2000) *Bacillus subtilis* *ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol* **182**: 5611-5614.
- Tyrrell, R., Verschueren, K.H., Dodson, E.J., Murshudov, G.N., Addy, C., and Wilkinson, A.J. (1997) The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* **5**: 1017-1032.
- Wang, E., Bauer, M.C., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D.T., and von Wachenfeldt, C. (2008) Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**: 466-478.
- Wilks, J.C., Kitko, R.D., Cleeton, S.H., Lee, G.E., Ugwu, C.S., Jones, B.D., BonDurant, S.S., and Slonczewski, J.L. (2009) Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 981-990.
- Yamamoto, I., and Ishimoto, M. (1975) Effect of nitrate reduction on the enzyme levels in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J Biochem* **78**: 307-315.
- Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. (2000) Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* **182**: 4458-4465.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.

9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mir stets unterstützend zur Seite standen:

Prof. Dr. Dieter Jahn für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine anregenden Ideen und die Möglichkeit, eine Dissertation mit einem spannenden Thema anfertigen zu können,

PD Dr. Ing. Max Schobert für die Übernahme des Koreferats,

Prof. Dr. André Fleißner für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes,

Dr. Elisabeth Härtig für die tolle Betreuung und Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit,

Anja Hartmann für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen im Laboralltag,

Boyke Bunk für die große Hilfe bei der Auswertung der Microarray-Daten,

Dr. Rebekka Biedendieck für ihre Hilfe und Unterstützung in allen Bereichen, ganz besonders für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit,

Ines „Le Tigre“ Gruner dafür, dass es sie gibt und sie immer für mich da ist,

Tanja „Magnum“ Piekarski für eine wahnsinnig, wahnsinnig, wahnsinnig schöne Zeit inner- und außerhalb des Labors,

Sabine „Ferrari“ Knauer für viele schöne Stunden und ein immer offenes Ohr,

Claudia „Klumpi“ Schulz für die besten Cupcakes, schönsten Kaffeepausen und entspannendsten Feierabendbiere der Welt,

Melanie „Das Kleine“ Burghartz für das Einhorn und das Pony - auch wenn es manchmal den Hut auf hat,

Petra Tielen für die stetige Bereitschaft, meine sozialen Kompetenzen an ihr verfeinern zu dürfen,

Stuntman-Isi für die eine oder andere Beleidigung,

Martin „Flöckchen“ Gamer für erinnerungswürdige Stunden in Frankfurts angesagtester Szenekneipe,

und der gesamten Arbeitsgruppe Jahn, besonders dem S2-Labor, für die zahlreichen Hilfestellungen sowie die wahrscheinlich weltweit beste Arbeitsatmosphäre.

Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Eltern ganz herzlich für alles, was sie in den letzten Jahren für mich getan haben und bei meiner Schwester Katharina und ihrem Mann Arne für ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Robert Köhler für all den Rückhalt, die Unterstützung, die aufbauenden Worte und seine Fähigkeit, mich auch in chaotischen Momenten beruhigen zu können.

10 ANHANG

Im Anhang befinden sich die Tabellen A-1 und A-2, in denen die Daten der Microarray-Analysen zu finden sind.

Tab. A-1. Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 40 mM Acetat. Beschrieben sind die Funktionen der Genprodukte in der Zelle, eine eventuell vorhandene Operonstruktur, der Genname („Accession“-Nummer in Klammern), die Beschreibung des Genprodukts, der natürliche Logarithmus des „Fold Changes“ sowie Vorhandensein und Lokalisation potentieller AlsR-Boxen. Deren Lokalisation ist im Verhältnis zum Translationsstartpunkt des jeweiligen Gens oder Operons angegeben. Als Schwellenwert für die differentielle Regulation eines Gens wurde ein Ln FC von +/-1,4 definiert. Gene, von denen bislang unbekannt ist, ob sie einzeln oder als Operon transkribiert werden, sind in der Spalte „Operonstruktur“ durch graue Schrift dargestellt.

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Acetoin-Synthese	<i>alsSD</i>	<i>alsS</i> (BG10471)	α-Acetolactatsynthase	4,68	TAAT-N ₁₁ -ATTA	108
		<i>alsD</i> (BG10472)	α-Acetolactatdecarboxylase	4,74		
		IGR_ <i>alsS-alsR</i>		1,40		
		IGR_ <i>alsD-alsS</i>		3,92		
		IGR_ <i>yvrO-alsD</i>		1,57		
	<i>alsR</i> (divergent)	<i>alsR</i> (BG10470)	Transkriptioneller Regulator des <i>alsSD</i> Operons	-1,35	TAAT-N ₁₁ -ATTA	29
Acetolactat-Synthese/ Synthese von BCAAs	<i>ilvBHC-leuABCD</i>	<i>ilvB</i> (BG10670)	Acetolactatsynthase (große Untereinheit)	1,20	TAAT-N ₁₁ -CTAA	48
		<i>ilvH</i> (BG10671)	Acetolactatsynthase (kleine Untereinheit)	1,45	TAAT-N ₁₁ -CTTT	32
		<i>ilvC</i> (BG10672)	Ketol-Säure Reduktoisomerase (2,3-Dihydroxy-3-Methylbutanoate, 2-Acetolactate)	1,24		
		<i>leuA</i> (BG11948)	2-Isopropylmalatsynthase	1,19		
		<i>leuB</i> (BG10675)	3-Isopropylmalatdehydrogenase	1,24		
		<i>leuC</i> (BG11949)	3-Isopropylmalatdehydratase (große Untereinheit)	1,33		
		<i>leuD</i> (BG11950)	3-Isopropylmalatdehydratase (kleine Untereinheit)	1,17		
		IGR_ <i>ilvB-ysnD</i>		1,14		
Deazidifikation	<i>oxdC-yvrL</i>	<i>oxdC</i> (BG14148)	Oxalatdecarboxylase; induziert in sauren Wachstumsmedien, jedoch nicht durch Oxalat: $\text{Oxalat} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Formiat} + \text{CO}_2$ sauerstoffabhängige Reaktion	3,02	TAAA-N ₁₁ -ATTT	227
					TGAT-N ₁₁ -ACTA	154
					TAAT-N ₁₁ -AAGT	137
					TCAT-N ₁₁ -ATTT	118
					TAAT-N ₁₁ -AGTT	105
					AAAT-N ₁₁ -TTTA	184
	<i>yvrI</i> (divergent)	<i>yvrI</i> (BG14147)	Alternativer σ-Faktor; aktiviert u.a. die Expression des <i>oxdC-yvrL</i> Operons	1,40		
		IGR_ <i>yvrI-oxdC</i>		1,93		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Biofilm / Sporulation	<i>yqxM-sipW-tasA</i>	<i>yqxM</i> (BG11076)	Unbekannt; Bildung von Biofilmen und Fruchtkörpern; essentiell für eine korrekte Lokalisation von TasA in die Matrix; wird durch SipW prozessiert	3,40	TTAT-N ₁₁ -AATA	234
					TATT-N ₁₁ -ATAA	233
					TAAT-N ₁₁ -TTAA	217
					TCAT-N ₁₁ -TTTA	170
					TAAT-N ₁₁ -ATTC	130
					TGAT-N ₁₁ -TTTA	125
		<i>sipW</i> (BG11696)	Typ I Signal Peptidase; Spaltung hydrophober, N-terminaler Signalsequenzen von sezernierten Proteinen	3,34		
Sporulation	<i>cotE</i>	<i>tasA</i> (BG11697)	Translokationsabhängige antimikrobielle Sporenkomponente	3,12		
		IGR_ <i>tasA-sipW</i>		2,70		
		IGR_ <i>yqxM-yqzG</i>		1,61		
	<i>cotE</i>	<i>cotE</i> (BG10494)	Morphogenetisches Protein, eventuell Tyrosinperoxidase; Anordnung des äußeren Sporenmantels; σ^E -abhängig	1,09	ACAT-N ₁₁ -ATTA	183
					TAAA-N ₁₁ -AATA	68
		IGR_ <i>ymcA-cotE</i>		1,26		
	<i>dacF-spoIIAA-spoIIAB-sigF</i>	<i>spoIIAA</i> (BG10296)	Anti-anti- σ^F ; Kontrolle der σ^F -Aktivität	1,89	TTAT-N ₁₁ -ACTA	77
					TAAT-N ₁₁ -TTTC	27
					TCAT-N ₁₁ -ATCA	14
					TCAT-N ₁₁ -ATGA	3
	<i>skfABCDEFGH-ybdG</i>	<i>spoIIAB</i> (BG10297)	Anti- σ^F / Protein-Serinkinase; Kontrolle der σ^F -Aktivität	1,96		
		<i>sigF</i> (BG10298)	RNA Polymerase vorsporenspezifischer, früher Sigma Faktor F (σ^F)	1,76		
		<i>skfA</i> (<i>ybcO</i>) (BG12713)	Sporentötungsfaktor; Töten von Schwesterzellen	1,56	TAGT-N ₁₁ -ATTT	126
					TATC-N ₁₁ -ATTA	105
					TATA-N ₁₁ -ATTA	100
					TAAT-N ₁₁ -ATTG	61

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>skfABCDEFGH-ybdG</i> (Fortsetzung)	<i>skfB</i> (<i>ybcP</i>) (BG10714)	Unbekannt; Synthese des Sporentötungsfaktors	1,77	TAAG-N ₁₁ -AATA	24
		<i>skfC</i> (<i>ybcS</i>) (BG10716)	Unbekannt; involviert in Sporenabtötung	1,59	TAAG-N ₁₁ -AGTA	14
		<i>skfD</i> (<i>ybcT</i>) (BG10717)	Unbekannt; Synthese des Sporentötungsfaktors	1,55		
		<i>skfE</i> (<i>ybdA</i>) (BG10718)	ABC-Transporter (bindendes Protein), Export des Sporentötungsfaktors	1,64		
		<i>skfF</i> (<i>ybdB</i>) (BG10719)	ABC-Transporter (Permease), Export des Sporentötungsfaktors	1,63		
		<i>skfG</i> (<i>ybdD</i>) (BG10720)	Unbekannt; exprimiert unter sporulationsfördernden Bedingungen	1,52		
		<i>skfH</i> (<i>ybdE</i>) (BG10721)	Unbekannt; exprimiert unter sporulationsfördernden Bedingungen	1,49		
		<i>ybdG</i> (BG10722)	Unbekannt	0,90		
		IGR_ <i>ybcM-ybcO</i>		1,32		
		IGR_ <i>ybcO-ybcP</i>		1,67		
		IGR_ <i>ybdA-ybdB</i>		1,24		
		IGR_ <i>ybdD-ybdE</i>		1,28		
		IGR_ <i>ybdE-ybdG</i>		1,0		
	<i>spoIIGA-sigE-sigG</i>	<i>spoIIGA</i> (BG10234)	Pro- σ^E Protease; Reifung von σ^E	1,05	TAAA-N ₁₁ -ATGA	158
					TAAT-N ₁₁ -AAAA	145
					TAAT-N ₁₁ -AATA	86
		<i>sigE</i> (BG10235)	RNA Polymerase mutterzellspezifischer, früher Sigma Faktor E (σ^E)	1,11	TGAT-N ₁₁ -ATTT	37
	<i>spoIVA</i>	<i>spoIVA</i> (BG10275)	Basisprotein für Sporenmantel-Anordnung; σ^E -abhängig	1,16	GAAA-N ₁₁ -ATTA	134
		IGR_ <i>spoIVA-yphF</i>		1,29	TGAT-N ₁₁ -AATA	37
	<i>spoVID</i>	<i>spoVID</i> (BG10346)	Sporenmantel-Anordnung; σ^E -abhängig	0,88		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>sspB</i>	<i>sspB</i> (BG10787)	Kleines säurelösliches Sporenprotein (Haupt β-Typ SASP); σ ^G -abhängig	-1,87	TGAT-N ₁₁ -TTTA AAAT-N ₁₁ -TTTA	131 4
	<i>yttP</i>	<i>yttP</i> (BG13927)	Unbekannt; exprimiert unter sporulationsfördernden Bedingungen	1,65		
	<i>ywcI-sacT</i>	<i>ywcI</i> (BG10592)	Unbekannt; Expression aktiviert durch Spo0A Transkriptioneller Antiterminator für das <i>sacP-sacA</i> Operon; Regulation von Saccharose-Verwendung; Expression aktiviert durch Spo0A	2,00	AAAT-N ₁₁ -ATAA	5
		<i>sacT</i> (BG10593)		2,25		
Zellwand und Membran		IGR_ <i>ywcI-vpr</i>		2,34		
	<i>yocH</i>	<i>yocH</i> (BG13521)	Unbekannt; Zellwand-bindendes Protein; wahrscheinlich Murein-Hydrolase; exprimiert unter sporulationsfördernden Bedingungen; eventuell beteiligt am Zellwand-Turnover	2,27	TAAA-N ₁₁ -ATTT TAAT-N ₁₁ -CTTT AAAT-N ₁₁ -GTTA CAAT-N ₁₁ -ATGA	201 82 76 71
		IGR_ <i>yocH-yocI</i>		1,60		
	<i>lrgAB</i>	<i>lrgA</i> (<i>ysbA</i>) (BG12311)	Antiholin-ähnliches Protein <i>lrgA</i> ; inhibiert Expression oder Aktivität extrazellulärer Mureinhydrolasen (wahrscheinlich durch Interaktion mit LrgB); Inhibierung des Holin-ähnlichen Proteins CidA	2,56	TTAT-N ₁₁ -TTTA TTAT-N ₁₁ -CTTA AAAT-N ₁₁ -GTGA GAAT-N ₁₁ -ATGA	55 39 36 29
		<i>lrgB</i> (<i>ysbB</i>) (BG12312)		1,87		
	<i>cidA-ywbG</i>	<i>cidA</i> (<i>ywbH</i>) (BG10569)	Holin-ähnliches Protein; Protein der CidA/LrgA-Familie; fügt Ionenkanäle in die Zellmembran; inhibiert durch LrgA und LrgB,	-2,34	AAAT-N ₁₁ -ATAA	51

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>AalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Zellwand und Membran (Fortsetzung)	<i>cidA-ywbG</i> (Fortsetzung)	<i>ywbG</i> (BG10568)	Peptidoglycan-Hydrolase; LrgB-Familie von <i>S. aureus</i> ; putatives Autolysin	-2,05		
Purinsynthese	<i>purEKBCSQLFMN</i> <i>HD</i>	<i>purE</i> (BG10700)	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (ATP-abhängig)	-1,54	TGAT-N ₁₁ -CTTA	234
					TATT-N ₁₁ -ATGA	205
					AAAT-N ₁₁ -ATTG	43
		<i>purK</i> (BG10701)	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase (ATP-abhängig)	-1,53		
		<i>purB</i> (BG10702)	Adenylsuccinatlyase	-1,58		
		<i>purC</i> (BG10703)	Phosphoribosylaminoimidazol-Succinocarboxamidsynthase	-1,60		
		<i>purS</i> (BG10704)	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase	-1,64		
		<i>purQ</i> (BG10706)	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase	-1,59		
		<i>purL</i> (BG10705)	Phosphoribosylformylglycinamidinsynthase	-1,59		
		<i>purF</i> (BG10707)	Glutaminphosphoribosyldiphosphatamidotransferase	-1,54		
		<i>purM</i> (BG10708)	Phosphoribosylaminoimidazolsynthetase	-1,45		
		<i>purN</i> (BG10709)	Phosphoribosylglycinamidformyltransferase	-1,50		
		<i>purH</i> (BG10710)	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamideformyltransferase und Inosinmonophosphat-Cyclohydrolase	-1,48		
		<i>purD</i> (BG10711)	Phosphoribosylglycinamidsynthetase	-1,46		
		IGR_ <i>yebG-purE</i>		-1,27		
		IGR_ <i>purB-purC</i>		-1,46		
		IGR_ <i>purF-purM</i>		-1,22		
Motilität und Chemotaxis	<i>hag</i>	<i>hag</i> (BG10655)	Flagellin-Protein; Bewegung und Chemotaxis	-1,88	TTTT-N ₁₁ -ATTA	123
	<i>yvyC-fliDST</i>	<i>yvyC</i> (BG10920)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit flagellarem Protein	-1,72	TGAT-N ₁₁ -ATTC	131
		<i>fliD</i> (BG10921)	Flagellares, Haken-assoziiertes Protein 2 (HAP2)	-1,68		
		<i>fliS</i> (BG10922)	Flagellares Protein	-1,65		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>AalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Motilität und Chemotaxis (Fortsetzung)	<i>yvyC-fliDST</i> (Fortsetzung)	<i>fliT</i> (BG10923)	Flagellares Protein	-1,67		
		IGR_ <i>hag-csrA</i>		-1,72		
		IGR_ <i>yvyC-hag</i>		-1,53		
		IGR_ <i>yvyD-fliT</i>		-1,26		
Transposon	<i>xis-ydcOPQ-nicK-ydcST-yddABC</i>	<i>xis</i> (<i>sacV</i>) (BG12670)	Excisionase; Excision des konjugativen Transposons ICEBs1 aus dem <i>trnS-leu2</i> Locus	2,01	TAAT-N ₁₁ -GTTA	187
		<i>ydcO</i> (BG12102)	Unbekannt	1,59	TAAT-N ₁₁ -ACTG	187
					AAAT-N ₁₁ -ATGA	184
					TAAG-N ₁₁ -ATAA	171
					CAAT-N ₁₁ -ATGA	151
					TAAT-N ₁₁ -TTCA	147
					TTTT-N ₁₁ -ATTA	138
		<i>ydcP</i> (BG12103)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit Transposon-Protein	1,65	TAAT-N ₁₁ -GTTG	136
					TAAT-N ₁₁ -GTTT	50
					TATT-N ₁₁ -ATTA	33
					TAAT-N ₁₁ -AGAA	28
					TCAT-N ₁₁ -ATTT	4
		<i>ydcQ</i> (BG10712)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit Transposon-Protein	1,14		
		<i>nicK</i> (<i>ydcR</i>) (BG12105)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit Transposon-Protein	0,96		
		<i>ydcS</i> (BG12106)	DNA-Relaxase, Ähnlichkeit mit Transposon-Protein; Konjugation von ICEBs1	0,89		
		<i>ydcT</i> (BG12107)	Unbekannt	0,94		
		<i>yddA</i> (BG12108)	Unbekannt	0,89		
		<i>yddB</i> (BG12109)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit Transposon-Protein	0,88		
		<i>yddC</i> (BG12110)	Unbekannt	0,91		
		IGR_ <i>xis-ydcO</i>		2,06		
		IGR_ <i>ydcO-ydcP</i>		1,97		
		IGR_ <i>nicK-ydcS</i>		0,87		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Oligopeptid-Transport	<i>appDFABC</i>	<i>appD</i> (BG11085)	Oligopeptid ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	1,33	TAAT-N ₁₁ -ATTT	166
					TATT-N ₁₁ -ATTA	163
					TAAT-N ₁₁ -ATAA	99
		<i>appF</i> (BG11086)	Oligopeptid ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	1,71		
		<i>appA</i> (BG11087)	Oligopeptid ABC-Transporter (Oligopeptid-bindendes Protein)	1,46		
		<i>appB</i> (BG11088)	Oligopeptid ABC-Transporter (Permease)	1,13 1,19		
		<i>appC</i> (BG11089)	Oligopeptid ABC-Transporter (Permease)			
Unbekannt	<i>pel</i>	<i>pel</i> (BG10840)	Pectat-Lyase C; Degradation von Polygalacturonsäure	-2,15	TTAT-N ₁₁ -AATA	46
		IGR_ <i>yflT-pel</i>		-1,67		
Unbekannt	<i>serS</i>	<i>serS</i> (BG10077)	Seryl-tRNA Synthetase	-1,69	TATT-N ₁₁ -AATA	19
Unbekannt	<i>yvzB</i>	<i>yvzB</i> (BG14158)	Unbekannt; Ähnlichkeit mit Flagellin	-1,85	GAAG-N ₁₁ -ATTA	9
Unbekannt	<i>yxbBA-yxnB-asnH-yxaM</i>	<i>yxbB</i> (BG11359)	Unbekannt; Methyltransferase-Superfamilie	1,92	TTAT-N ₁₁ -ATTG	233
					TAAT-N ₁₁ -GCTA	182
					TAAT-N ₁₁ -TTTG	165
					TTAT-N ₁₁ -ATTG	115
					TAAT-N ₁₁ -GCTA	64
		<i>yxbA</i> (<i>aslA</i>) (BG11351)	Unbekannt; wahrscheinlich D-Aspartat-Ligase	1,74		
		<i>yxnB</i> (BG14166)	Unbekannt	1,71		
		<i>asnH</i> (BG11116)	Asparaginsynthase (Glutamin-hydrolysierend); Biosynthese von Asparagin	1,20		
		IGR_ <i>yxbC-yxbB</i>		2,09		

Tab. A-2. Das AlsR-Regulon unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit verringertem externen pH-Wert (pH 6). Beschrieben sind die Funktionen der Genprodukte in der Zelle, eine eventuell vorhandene Operonstruktur, der Genname („*Accession*“-Nummer in Klammern), die Beschreibung des Genprodukts, der natürliche Logarithmus des „*Fold Changes*“ sowie Vorhandensein und Lokalisation potentieller AlsR-Boxen. Deren Lokalisation ist im Verhältnis zum Translationsstartpunkt des jeweiligen Gens oder Operons angegeben. Als Schwellenwert für die differentielle Regulation eines Gens wurde ein Ln FC von +/-1,4 definiert. Gene, von denen bislang unbekannt ist, ob sie einzeln oder als Operon transkribiert werden, sind in der Spalte „Operonstruktur“ durch graue Schrift dargestellt.

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Acetoin-Synthese	<i>alsSD</i>	<i>alsS</i> (BG10471)	α -Acetolactatsynthase	4,44	TAAT-N ₁₁ -ATTA	108
		<i>alsD</i> (BG10472)	α -Acetolactatdecarboxylase	4,53		
		IGR_ <i>alsS-alsR</i>		1,19		
		IGR_ <i>alsD-alsS</i>		3,43		
		IGR_ <i>ywrO-alsD</i>		1,57		
	<i>alsR</i> (divergent)	<i>alsR</i> (BG10470)	Transkriptioneller Regulator des <i>alsSD</i> Operons	-2,07	TAAT-N ₁₁ -ATTA	29
Acetoin-Verwertung	<i>acoABCL</i>	<i>acoA</i> (BG12558)	Acetoindehydrogenase E1 Komponente (TPP-abhängige α -Untereinheit)	2,72	TAAT-N ₁₁ -AATA	17
		<i>acoB</i> (BG12559)	Acetoindehydrogenase E1 Komponente (TPP-abhängige β -Untereinheit)	2,38		
		<i>acoC</i> (BG12560)	Acetoindehydrogenase E2 Komponente (Dihydrolipoamid Acetyltransferase)	2,42		
		<i>acoL</i> (BG12561)	Acetoindehydrogenase E3 Komponente (Dihydrolipoamid Dehydrogenase)	1,90		
		IGR_ <i>yfjL-acoA</i>		1,44		
Stressantwort	<i>katA</i>	<i>katA</i> (BG10849)	Vegetative Katalase I	2,18	TAAT-N ₁₁ -ATTG	54
					TAAT-N ₁₁ -AATA	57
Biofilm / Sporulation	<i>yqxM-sipW-tasA</i>	<i>yqxM</i> (BG11076)	Unbekannt; Bildung von Biofilmen und Fruchtkörpern; essentiell für eine korrekte Lokalisation von TasA in die Matrix; wird durch SipW prozessiert	1,29	TTAT-N ₁₁ -AATA	234
					TATT-N ₁₁ -ATAA	233
					TAAT-N ₁₁ -TTAA	217
					TCAT-N ₁₁ -TTTA	170
					TAAT-N ₁₁ -ATTC	130
					TGAT-N ₁₁ -TTTA	125

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Biofilm / Sporulation (Fortsetzung)	<i>yqxM-sipW-tasA</i> (Fortsetzung)	<i>sipW</i> (BG11696)	Typ I Signal Peptidase; Spaltung hydrophober, N-terminaler Signalsequenzen von sezernierten Proteinen	0,89		
		<i>tasA</i> (BG11697)	Translokationsabhängige antimikrobielle Sporenkomponente	1,09		
		IGR_ <i>tasA-sipW</i>		0,84		
Sporulation	<i>cgeAB</i>	<i>cgeA</i> (BG11193)	Unbekannt; Reifung der äußersten Sporenschicht; σ^K -abhängig	2,25	TATT-N ₁₁ -ATAA	166
		<i>cgeB</i> (BG11194)	Unbekannt; Reifung der äußersten Sporenschicht; σ^K -abhängig	2,46	TATT-N ₁₁ -AATA	21
	<i>comER</i>	<i>comER</i> (BG10479)	Nicht-essentielles Gen für Kompetenz; wahrscheinlich Pyrrolin-5'-Carboxylatreduktase; σ^E -abhängig	1,75	TTAT-N ₁₁ -ATGA TAAA-N ₁₁ -ATGA	44 31
	<i>cotA</i>	<i>cotA</i> (BG10490)	Äußeres Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	2,11		
	<i>cotD</i>	<i>cotD</i> (BG10493)	Inneres Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; NhaC Na ⁺ /H ⁺ Antiporter-Familie; σ^K -abhängig	2,78	TAAT-N ₁₁ -AAAA TACT-N ₁₁ -AATA TAAC-N ₁₁ -ATAA TTAT-N ₁₁ -TTTA	82 34 25 3
		IGR_ <i>cotD-yprB</i>		1,68		
		IGR_ <i>ypsA-cotD</i>		1,65		
	<i>cotE</i>	<i>cotE</i> (BG10494)	Morphogenetisches Protein, eventuell Tyrosin-peroxidase; Anordnung des äußeren Sporenmantels; σ^E -abhängig	3,82	ACAT-N ₁₁ -ATTA TAAA-N ₁₁ -AATA	183 68
		IGR_ <i>ymcA-cotE</i>		1,88		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>cotF</i>	<i>cotF</i> (BG10012)	Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	2,72	TTAT-N ₁₁ -ATTA TGAT-N ₁₁ -TTTA	276 65
	<i>cotG</i>	<i>cotG</i> (BG11017)	Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	3,5	AAAT-N ₁₁ -ATTA TAAA-N ₁₁ -ATTT	119 106
	<i>cotHB</i> (divergent von <i>cotG</i>)	<i>cotH</i> (BG11791)	Inneres Sporenmantel Protein; Schutz von CotU und CotC in der Mutterzelle; σ^K -abhängig	1,04	TAAA-N ₁₁ -ATTT AAAT-N ₁₁ -ATTA	17 4
		<i>cotB</i> (BG10491)	Äußeres Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	2,16	CAAT-N ₁₁ -ATTA GAAT-N ₁₁ -ATAA	76 63
	<i>cotJA-JB-JC-yesJ-yesK</i>	<i>cotJA</i> (BG11799)	Unbekannt; Polypeptid-Komposition des Sporenmantels; σ^E -abhängig	2,15	TAAT-N ₁₁ -AGGA	33
		<i>cotJB</i> (BG11800)	Unbekannt; Polypeptid-Komposition des Sporenmantels; σ^E -abhängig	2,06		
		<i>cotJC</i> (BG11801)	Unbekannt; Polypeptid-Komposition des Sporenmantels; σ^E -abhängig	2,25		
		<i>yesJ</i> (BG11809)	Unbekannt; N-Acetyltransferase-Domäne; σ^E -abhängig	1,01		
		IGR_ <i>cotJC-yesJ</i>		1,43		
	<i>cotM</i>	<i>cotM</i> (BG11822)	Äußeres Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	2,33	TAAA-N ₁₁ -ATAA	35
		IGR_ <i>yneK-cotM</i>		1,62		
	<i>cotO</i> (<i>yjbX</i>)	<i>cotO</i> (<i>yjbX</i>) (BG13153)	Morphogenetisches Sporenmantel-Protein; kontrolliert Anordnung der Mantelschichten und der Oberflächen-Topographie; σ^E -abhängig	2,11	CAAT-N ₁₁ -ATTG TCAT-N ₁₁ -ATGA	65 14
	<i>cotVWXYZ</i>	<i>cotV</i> (BG10496)	Sporenmantel Protein (unlösliche Fraktion); Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	4,69	AAAT-N ₁₁ -ATTG TTAT-N ₁₁ -ATAA	59 17

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>cotWXYZ</i> (Fortsetzung)	<i>cotW</i> (BG10497)	Sporenmantel Protein (unlösliche Fraktion); Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	4,72		
		<i>cotX</i> (BG10500)	Sporenmantel Protein (unlösliche Fraktion); Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	4,95	TAAG-N ₁₁ -TTTA TAAT-N ₁₁ -AAAA	30 13
		<i>cotY</i> (BG10498)	Sporenmantel Protein (unlösliche Fraktion); Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	4,48	TTAT-N ₁₁ -ATGA TAAG-N ₁₁ -AATA	97 26
		<i>cotZ</i> (BG10499)	Sporenmantel Protein (unlösliche Fraktion); Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	3,91		
		IGR_ <i>cotY-cotX</i>		2,58		
		IGR_ <i>cotZ-cotY</i>		2,36		
	<i>ctpB</i> (<i>yvjB</i>)	<i>ctpB</i> (<i>yvjB</i>) (BG14110)	C-terminal prozessierende Serinprotease, spaltet SpoIVFA, was in der Prozessierung von prä- σ^K resultiert; σ^E -abhängig; σ^G -abhängig	1,79	TCTT-N ₁₁ -ATTA	77
	<i>dacF-spoIIAA-spoIIAB-sigF</i>	<i>dacF</i> (BG10295)	Penicillin-bindendes Protein I, D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase; σ^F -abhängig; σ^G -abhängig	2,03	GAAA-N ₁₁ -ATTA	21
		<i>spoIIAA</i> (BG10296)	Anti-anti- σ^F ; Kontrolle der σ^F -Aktivität	1,59	TTAT-N ₁₁ -ACTA TAAT-N ₁₁ -TTTC TCAT-N ₁₁ -ATCA TCAT-N ₁₁ -ATGA	77 27 14 3
		<i>spoIIAB</i> (BG10297)	Anti- σ^F / Protein-Serinkinase; Kontrolle der σ^F -Aktivität	1,53		
		<i>sigF</i> (BG10298)	RNA Polymerase vorskosporenspezifischer, früher Sigma Faktor F (σ^F)	1,40		
		<i>gerE</i> (BG10355)	Transkriptioneller Regulator, der für die Expression σ^K -regulierter später Sporulationsgene benötigt wird; σ^K -abhängig	2,49	TGAT-N ₁₁ -ATCA	53
		IGR_ <i>ysmB-gerE</i>		1,56		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>AalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>gerPA-PB-PC-PD-PE-PF</i>	<i>gerPA</i> (BG13095)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,00	TAAC-N ₁₁ -ATAA TCAT-N ₁₁ -AATA GAAT-N ₁₁ -TTTA	154 74 40
		<i>gerPB</i> (BG13094)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,07		
		<i>gerPC</i> (BG13093)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,39		
		<i>gerPD</i> (BG13092)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,02		
		<i>gerPE</i> (BG13091)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,04		
		<i>gerPF</i> (BG13090)	Unbekannt; wahrscheinlich Sporen-Germinations-Protein; σ^K -abhängig	3,22	TAAA-N ₁₁ -ATAA	4
		<i>gerT</i> (<i>yozR</i>)	<i>gerT</i> (<i>yozR</i>) (BG14190)	Sporenmantel-Protein; beteiligt an der Germination; σ^K -abhängig	1,88	
	<i>gerQ</i> (<i>ywdL</i>)	<i>gerQ</i> (<i>ywdL</i>) (BG10608)	Sporenmantel-Protein, benötigt für die Lokalisation von CwlJ; Reifung des Sporenmantels; wird durch YabG und Tgl bei höheren Temperaturen, die eine Auskeimung induzieren, quervernetzt	2,20		
	<i>kamA-yozE</i>	<i>kamA</i> (BG135429)	Lysin-2,3-Aminomutase; Lysin-Degradation; σ^E -abhängig	1,16		
		<i>yozE</i> (BG13752)	Unbekannt	0,85	TAGT-N ₁₁ -ATTG TATT-N ₁₁ -ATTT AAAT-N ₁₁ -ACTG	103 56 43
		IGR_ <i>yozE-kamA</i>		1,60		
	<i>spoIIIGA-sigE-sigG</i>	<i>sigG</i> (BG10236)	RNA Polymerase -vorsporenspezifischer, später Sigma-Faktor G (σ^G); σ^G -abhängig; σ^F -abhängig	2,09		
	<i>spoIVCB</i>	<i>spoIVCB</i> (BG10459)	RNA-Polymerase-sporulationsspezifischer Sigma-Faktor (σ^K), N-terminale Hälfte	2,94		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>spoIIIC</i>	<i>spoIIIC</i> (BG10919)	RNA-Polymerase sporulationsspezifischer Sigma-Faktor (σ^K), C-terminale Hälfte	2,88		
	<i>spoIVA</i>	<i>spoIVA</i> (BG10275)	Basisprotein für Sporenmantel-Anordnung; σ^E -abhängig	2,3	GAAA-N ₁₁ -ATTA	134
		IGR_ <i>spoIVA-yphF</i>		2,57	TGAT-N ₁₁ -AATA	37
	<i>spoVID</i>	<i>spoVID</i> (BG10346)	Sporenmantel-Anordnung; σ^E -abhängig	2,92		
	<i>spoVIF (yjcC)</i>	<i>spoVIF (yjcC)</i> (BG13156)	Unbekannt; benötigt für Sporenmantel-Anordnung und Resistenz der Spore; σ^K -abhängig	3,05	TAAA-N ₁₁ -AACA	124
		IGR_ <i>yjcB-yjcC</i>		1,79		
	<i>spoVFA-spoVFB-asd-dapG-dapA</i>	<i>spoVFA</i> (BG10781)	Dipicolinatsynthase (Untereinheit A); Dipicolisäureproduction; σ^K -abhängig	2,89	TATT-N ₁₁ -ATAA	60
		<i>spoVFB</i> (BG10782)	Dipicolinatsynthase (Untereinheit B); Dipicolisäureproduction; σ^K -abhängig	3,03	TAAG-N ₁₁ -CTTA	44
		<i>asd</i> (BG10783)	Aspartatsemialdehyddehydrogenase	1,07	TGAT-N ₁₁ -TTTA	37
		IGR_ <i>spoVFB-asd</i>		1,22		
	<i>spoVK</i>	<i>spoVK</i>	Unbekannt; benötigt für Reifung der Spore; σ^E -abhängig; σ^K -abhängig	2,24	TCAT-N ₁₁ -ATTA	186
					TAAT-N ₁₁ -AGTA	183
					TCAT-N ₁₁ -ATTG	62
	<i>usd-spoIIID</i>	<i>usd</i> (BG11984)	Eventuell <i>spoIIID</i> Signalpeptid; benötigt für Translation von <i>spoIIID</i> ; σ^E -abhängig	2,89	TACT-N ₁₁ -TTTA	193
					TAAT-N ₁₁ -TTTT	172
					GAAT-N ₁₁ -GTTA	37

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>usd-spoIIID</i> (Fortsetzung)	<i>spoIIID</i> (BG10408)	Transkriptioneller Regulator von σ^E - und σ^K -abhängigen Genen; σ^E -abhängig	2,93		
		IGR_ <i>mbl-spoIIID</i>		1,31		
		IGR_ <i>usd-ywoH</i>		1,21		
	<i>spsABCDEFGHIJKL</i>	<i>spsA</i> (BG10609)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,92		
		<i>spsB</i> (BG10610)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,69		
		<i>spsC</i> (BG10611)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,51		
		<i>spsD</i> (BG10612)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,75		
		<i>spsE</i> (BG10613)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,56		
		<i>spsF</i> (BG10614)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,54		
		<i>spsG</i> (BG10615)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,48		
		<i>spsI</i> (BG10617)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,78		
		<i>spsJ</i> (BG10618)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,60		
		<i>spsK</i> (BG10619)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,44		
		<i>spsL</i> (BG14195)	Unbekannt; Sporenmantel-Polysaccharidsynthese; σ^K -abhängig	1,20		
		<i>tgl</i>	<i>tgl</i> (BG10946)	Transglutaminase; Quervernetzung von Sporenmantel-Proteinen; σ^K -abhängig	1,75	TAAA-N ₁₁ -ATAA

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>yabG</i>	<i>yabG</i> (BG10106)	Protease; temperaturabhängige Modifikation von Sporenmantel-Proteinen wie GerQ (in Kombination mit Tgl)	1,57		
	<i>ydfR</i>	<i>ydfR</i> (BG12165)	Unbekannt; σ^G -abhängig	1,61		
	<i>ydfS</i> (divergent von <i>ydfR</i>)	<i>ydfS</i> (BG12166)	Unbekannt; σ^G -abhängig	1,18		
		IGR_ <i>ydfR</i> - <i>ydfS</i>		1,48		
	<i>ydgB-ydgA-cotP</i>	<i>ydgB</i> (BG12169)	Unbekannt; σ^K -abhängig	1,73	GTAT-N ₁₁ -ATTA TTAG-N ₁₁ -ATTA AAAT-N ₁₁ -TTTA TAAC-N ₁₁ -ATTG TAAA-N ₁₁ -ATTG	234 218 165 142 52
	<i>ydgB-ydgA-cotP</i>	<i>ydgA</i> (BG12168)	Unbekannt; σ^K -abhängig	1,32		
		<i>cotP</i> (BG12167)	Wahrscheinlich Sporenmantel-Protein; Resistenz der Spore; Kleine Hitzeschock Protein (HSP20)-Familie; σ^K -abhängig	1,37		
	<i>yeaA</i>	<i>yeaA</i> (BG12210)	Unbekannt; σ^E -abhängig; σ^W -abhängig	1,74		
	<i>yhcO</i>	<i>yhcO</i> (BG11593)	Unbekannt; während der Sporulation exprimiert; σ^E -abhängig; σ^K -abhängig	2,04		
	<i>yheCD</i>	<i>yheC</i> (BG13035)	Unbekannt; lokalisiert in der äußeren Membran der Vorpore; σ^E -abhängig	2,39	TATG-N ₁₁ -ATTA TATT-N ₁₁ -AATA	204 87
		<i>yheD</i> (BG13036)	Unbekannt; lokalisiert in der äußeren Membran der Vorpore; σ^E -abhängig	2,49		
	<i>yhfM</i>	<i>yhfM</i> (BG13058)	Unbekannt; σ^F -abhängig	1,71	TAAT-N ₁₁ -ATTC TAAG-N ₁₁ -ATGA	92 89

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>yhjR</i>	<i>yhjR</i> (BG13084)	Unbekannt; σ^E -abhängig; σ^K -abhängig	1,60	ACAT-N ₁₁ -ATTA	74
	<i>yitBA-yisZ</i>	<i>yitB</i> (BG13107)	Phosphoadenylylsulfat-Sulfotransferase; Sulfatreduktion und -aktivierung; σ^K -abhängig	1,87	TAAC-N ₁₁ -ATAA	150
		<i>yitA</i> (BG13106)	Sulfatadenylyltransferase; Sulfatreduktion und Aktivierung; σ^K -abhängig	2,15	TGAT-N ₁₁ -ATTA TAAT-N ₁₁ -ATTC TTTT-N ₁₁ -ATTA	240 143 20
		<i>yisZ</i> (BG13105)	Adenylylsulfatkinase; Sulfatreduktion und Aktivierung; σ^K -abhängig	1,86		
	<i>yitCD</i> (divergent von <i>yitBA-yisZ</i>)	<i>yitC</i> (BG13108)	Unbekannt; σ^E -abhängig; σ^K -abhängig	2,10	TAAC-N ₁₁ -ATAA	137
		<i>yitD</i> (BG13109)	Unbekannt; σ^E -abhängig; σ^K -abhängig	1,74		
	<i>yknT</i>	<i>yknT</i> (BG12251)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu Sporulations-Protein; σ^E -abhängig	1,92	GAAT-N ₁₁ -ATTT TATT-N ₁₁ -ATCA	40 18
	<i>yozN-yocN</i>	<i>yozN</i> (BG13761)	Unbekannt; Kleine Hitzeschock Protein (HSP20)-Familie; σ^E -abhängig	2,58		
		<i>yocN</i> (BG13527)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu Permease; σ^E -abhängig	2,15		
	<i>yqfQ</i>	<i>yqfQ</i> (BG11663)	Unbekannt; σ^K -abhängig	2,05	TAAT-N ₁₁ -AGGA TAAG-N ₁₁ -ATAA	140 105
	<i>yqfT</i>	<i>yqfT</i> (BG11666)	Unbekannt; σ^E -abhängig	2,03		
	<i>yrbG</i>	<i>yrbG</i> (BG13786)	Unbekannt; σ^G -abhängig	1,63		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	In FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Sporulation (Fortsetzung)	<i>ysnD</i>	<i>ysnD</i> (BG12335)	Unbekannt; σ^K -abhängig	1,98	TAAT-N ₁₁ -AAAA	185
					TAGA-N ₁₁ -ATTA	180
					TATT-N ₁₁ -AATA	171
					TAAT-N ₁₁ -CTTG	160
					AAAT-N ₁₁ -ATTC	157
					TAAT-N ₁₁ -ATGG	139
					TCTT-N ₁₁ -ATTA	13
	<i>ysxE</i>	<i>ysxE</i> (BG10347)	Unbekannt; σ^E -abhängig	1,96		
	<i>ytABC</i>	<i>ytA</i> (BG13828)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu NDP-Zuckerdehydrogenase; σ^K -abhängig	2,45	ATAT-N ₁₁ -ATTA	31
		<i>ytB</i> (BG13829)	Unbekannt; wahrscheinlich UDP-Glucose-Epimerase; σ^K -abhängig	2,21	TACT-N ₁₁ -AATA	23
		<i>ytC</i> (BG13830)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu Lipopolysaccharid-N-Acetylglucosaminyltransferase; σ^K -abhängig	2,60		
	<i>ytACD</i>	<i>ytA</i> (BG13873)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu ABC-Transporter (Bindepotein); σ^K -abhängig	2,64	TAAT-N ₁₁ -CTTT	30
		<i>ytC</i> (BG13875)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu Anionentransport ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein); σ^K -abhängig	1,89		
		<i>ytD</i> (BG13876)	Unbekannt; Ähnlichkeit zu ABC-Transporter (Permease); σ^K -abhängig	1,77		
	<i>yusN</i>	<i>yusN</i> (BG14026)	Unbekannt; exprimiert in der Vospore; σ^G -abhängig	1,68	TGAT-N ₁₁ -ATAA	201
					TATT-N ₁₁ -ATCA	61
		IGR_ <i>yusM-yusN</i>		1,59	TAAT-N ₁₁ -GTGA	58
	<i>yuzF</i>	<i>yuzF</i> (BG14055)	Unbekannt; σ^K -abhängig	1,67		
	<i>yxE</i>	<i>yxE</i> (BG11881)	Unbekannt; σ^K -abhängig	3,75		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	Ln FC WT/ <i>AalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Zellwand und Membran	<i>yocH</i>	<i>yocH</i> (BG13521)	Unbekannt; Zellwand-bindendes Protein; wahrscheinlich Murein-Hydrolase; Expression des Gens unter sporulationsfördernden Bedingungen; evtl. beteiligt am Zellwand-Turnover	1,44	TAAA-N ₁₁ -ATTT	201
					TAAT-N ₁₁ -CTTT	82
					AAAT-N ₁₁ -GTTA	76
		IGR_ <i>yocH-yocI</i>		0,98	CAAT-N ₁₁ -ATGA	71
	<i>lrgAB?</i>	<i>lrgA</i> (<i>ysbA</i>) (BG12311)	Antiholin-ähnliches Protein <i>lrgA</i> ; inhibiert Expression oder Aktivität extrazellulärer Mureinhydrolasen (wahrscheinlich durch Interaktion mit LrgB); Inhibierung des Holin-ähnlichen Proteins CidA	2,02	TTAT-N ₁₁ -TTTA	55
					TTAT-N ₁₁ -CTTA	39
					AAAT-N ₁₁ -GTTA	36
		<i>lrgB</i> (<i>ysbB</i>) (BG12312)	Antiholin-ähnliches Protein <i>lrgB</i> ; inhibiert Expression oder Aktivität extrazellulärer Mureinhydrolasen (wahrscheinlich durch Interaktion mit LrgA); Inhibierung des Holin-ähnlichen Proteins CidA	1,62	GAAT-N ₁₁ -ATGA	29
	<i>cidA-ywbG?</i>	<i>cidA</i> (<i>ywbH</i>) (BG10569)	Holin-ähnliches Protein; Protein der CidA/LrgA-Familie; fügt Ionenkanäle in die Zellmembran; Inhibiert durch LrgA und LrgB	-1,56	AAAT-N ₁₁ -ATAA	51
		<i>ywbG</i> (BG10568)	Peptidoglycan-Hydrolase; LrgB-Familie von <i>S. aureus</i> ; putatives Autolysin	-1,64		
Pyrimidinsynthese	<i>pyrRPBC-AA-AB-KDFE</i>	<i>pyrR</i> (BG10712)	Transkriptioneller Antiterminator des <i>pyr</i> Operons	0,89	TATT-N ₁₁ -ATTA	143
		<i>pyrP</i> (BG10992)	Uracil-Permease	0,92	TGAT-N ₁₁ -ATTT	14
		<i>pyrB</i> (BG10713)	Aspartatcarbamoyltransferase	1,67	CAAT-N ₁₁ -TTTA	71
		<i>pyrC</i> (BG10714)	Dihydroorotase	1,76		
		<i>pyrAA</i> (BG10715)	Carbamoylphosphatesynthetase (Glutaminase Untereinheit)	1,70		
		<i>pyrK</i> (BG10717)	Dihydroorotsäure-Dehydrogenase (Elektronentransfer Untereinheit)	1,57		
		<i>pyrD</i> (BG10718)	Dihydroorotsäure-Dehydrogenase (Katalytische Untereinheit)	1,67		

Funktion in der Zelle	Operonstruktur	Gen	Genprodukt/Beschreibung	ln FC WT/ <i>ΔalsR</i>	Potentielle AlsR-Box	Distanz zu ATG
Pyrimidin-synthese (Fortsetzung)	<i>pyrRPBC-AA-AB-KDFE</i> (Fortsetzung)	<i>pyrF</i> (BG10719)	Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase	1,63		
		<i>pyrE</i> (BG10720)	Orotatphosphoribosyltransferase	1,61		
		IGR_ <i>pyrP-pyrB</i>		1,25		
		IGR_ <i>pyrR-pyrP</i>		0,87		
Unbekannt	<i>argCJBDA-carA-carB-argF</i>	<i>carB</i> (BG10196)	Carbamoylphosphat-Transferase-Arginin (Untereinheit B)	1,75		
Unbekannt	<i>ythAB?</i>	<i>ythA</i> (BG13857)	Cytochrom bd2, Menaquinon-Oxidase (7:1 Protonen)	1,24	TAAT-N ₁₁ -ATTG	188
					AAAT-N ₁₁ -ATTA	178
					TGCT-N ₁₁ -ATTA	71
					TTAT-N ₁₁ -GTAA	66
					TATT-N ₁₁ -ATTT	53
Unbekannt	<i>pel</i>	<i>ythB</i> (BG13858)	Cytochrom bd2, Menaquinon-Oxidase (7:1 Protonen)	1,66		
Unbekannt	<i>pel</i>	<i>pel</i> (BG10840)	Pectat-Lyase C; Degradation von Polygalacturonsäure	-1,59	TTAT-N ₁₁ -AATA	46
		IGR_ <i>yflT-pel</i>		-1,30		
Unbekannt	<i>yqzG</i>	<i>yqzG</i>	Unbekannt	1,75	TGAT-N ₁₁ -TTTA	129
					TAAT-N ₁₁ -ATTC	124
					TAAT-N ₁₁ -TTAA	37
					TATT-N ₁₁ -ATAA	21
					TTAT-N ₁₁ -AATA	20